



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme SAHAR AWDE

le mercredi 30 avril 2014

Titre :

RELATION ENTRE PROTEOLYSE HEPATIQUE ET QUALITES
TECHNOLOGIQUES ET SENSORIELLES DU FOIE GRAS DE CANARD

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Génétique, Physiologie et Systèmes d'élevage (GenPhySE)

Directeur(s) de Thèse :

M. HERVE REMIGNON

Rapporteurs :

M. DANIEL BECHET, INRA CLERMONT FERRAND

M. STÉPHANE DAVAIL, UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L ADOUR

Membre(s) du jury :

M. HERVE REMIGNON, INP TOULOUSE, Président

M. AHMED OUALI, INRA CLERMONT FERRAND, Membre

Mme CAROLINE MOLETTE, INP TOULOUSE, Membre

Je dédie ce travail

A ma très chère mère Wafaa

*La source de tendresse et l'exemple du dévouement qui
n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.*

A mon cher fiancé Samer

Sans ton aide, tes conseils et tes encouragements,

ce travail n'aurait pas vu le jour.

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire de thèse ont été réalisés à l'UMR 1388 GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevage).

Je remercie Messieurs Daniel Béchet et Stéphane Davail qui me font l'honneur de participer à ce jury en tant que rapporteurs et à Madame Caroline Molette et Monsieur Ahmed Ouali en tant qu'examineurs.

J'adresse tous mes remerciements à Monsieur Hervé Remignon, Professeur à l'INP-ENSAT pour avoir dirigé cette thèse. Je le remercie plus particulièrement pour sa patience, la qualité de son encadrement et ses conseils scientifiques.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à l'Association Islamique pour la Spécialisation et l'Orientation Scientifique et notamment au Dr. Mohammed Makhzoum pour la bourse de thèse qui m'a été attribuée.

Je tiens à remercier M. Xavier Fernandez, Directeur du laboratoire, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je le remercie aussi, ainsi que Messieurs Ahmed Ouali et Stéphane Davail, pour la participation à mon comité de thèse.

Je remercie l'ensemble des personnels de l'Ex-équipe TANDEM :

- Merci à Nathalie Marty-Gasset et Stéphane Seidlinger pour leur bonne humeur et leurs attitudes toujours positives et motivantes.
- Merci à Hélène Manse et Corinne Pautot pour leur sympathie, leur aide et leurs conseils techniques.
- Merci à Caroline Molette, Michel Bouilliet-Oudot, Cécile Bonnefont, Mathilde Brachet, Christine Julien et Corinne Bayourthe pour leur gentillesse et leur soutien.
- Merci à Hubert, Anaïs, Viviana, Anna, Giulia, Yoannah, Julien, Michaël, Rawane, Michèle, Laëtitia, Nadia, Aurélie, Hélène, Madonna, Romain, Marine et Marie pour les bons moments partagés en pauses et en soirées. Je souhaite également remercier les amis qui sont présents quoi qu'il arrive, merci Carole et Florian pour votre amitié.

Et pour finir un très affectueux remerciement à ma famille, ma belle-famille et mes proches qui ont toujours cru en moi, mes parents pour leur soutien permanent, mes sœurs et frères et surtout Ali qui s'est occupé de faire tous mes papiers pendant ces trois années. Je vous aime beaucoup.

RESUME

Différents facteurs sont connus pour affecter les paramètres de qualité du foie gras. Parmi ces paramètres, la fonte est considérée comme étant la plus critique du point de vue des producteurs et des consommateurs. Outre les facteurs déjà connus, le but de ce travail est d'étudier si les activités protéolytiques hépatiques pourraient jouer un rôle dans le déterminisme de la qualité du foie gras. Pour atteindre cet objectif, trois expérimentations ont été menées, dans lesquelles nous avons utilisé des approches biochimiques et protéolytiques ainsi que des mesures de qualité. Dans ces trois expériences nous avons évalué : 1) l'effet du gavage chez deux types génétiques de canards, 2) l'effet de la vitesse de refroidissement et du stockage post mortem et 3) l'effet de la variabilité de taux de fonte sur les activités protéolytiques.

Nos résultats montrent que les activités protéolytiques restent constantes ou baissent avec le gavage. De plus, malgré des différences connues quant à leur capacité à développer une stéatose hépatique, les canards de Barbarie et les canards Pékin ont réagi de la même façon en ce qui concerne leurs activités protéolytiques. En ce qui concerne l'effet des différentes vitesses de refroidissement, nous avons montré que plus le refroidissement est lent, plus le foie fond et que ceci est –au moins partiellement- due à des activités protéolytiques plus élevées. Finalement, nous avons montré que les foies à fonte élevée présentent également des activités protéolytiques supérieures à celles des foies à fonte faible.

Dans cette thèse, nous avons pu mettre en évidence certaines relations existantes entre la protéolyse hépatique et les qualités du foie gras de canard. Cependant, d'autres études seront nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes responsables de ces relations dans le but d'exploiter le potentiel des protéases dans la maîtrise de la qualité du foie gras

Mots clé : Protéolyse, foie gras, protéomique, fonte, qualité

ABSTRACT

Different factors are known to affect the quality parameters of « foie gras ». Among those parameters, the cooking loss is considered to be the most critical one in the eyes of both producers and consumers. Besides already known factors, the objective of this work is to investigate whether proteolytic activities might play a role in the determinism of « foie gras » cooking losses. To achieve this objective three experiments were conducted in which we used biochemical and proteomic approaches as well as quality analysis. In these three different experiments we evaluated: 1) the effect of overfeeding in two breeds of ducks (Muscovy and Pekin ducks) 2) the effect of chilling rate and post mortem storage and 3) the effect of cooking loss variability on proteolytic activities.

Our results show that overfeeding either does not affect proteases activities, either causes their decrease. In addition, despite the known differences regarding their ability to develop hepatic steatosis, in our study Muscovy and Pekin ducks' proteolytic activities responded similarly to overfeeding. Concerning the effect of chilling rates, we showed that the slower the chilling rate the higher the melting after cooking. This result is - at least partially- due to higher proteolytic activities. Finally we showed that livers with a high melting rate presented higher proteolytic activities than those with a low melting rate.

In this thesis, we were able to expose certain relations between hepatic proteolysis and fatty liver qualities. However, more studies are required to better understand the mechanisms underlying these relations in the goal of exploiting the potential of proteases in fatty liver quality control.

Keywords: Proteolysis, fatty liver, cooking loss, quality.

INTRODUCTION

Le foie gras est un produit typique de la gastronomie française obtenu par le gavage (alimentation forcée) de certains palmipèdes. L'aptitude à stocker spontanément l'énergie dans le foie sous la forme de lipides est une spécificité physiologique des palmipèdes sauvages avant la migration qui est exploitée pour produire du foie gras par gavage (Bairlein, 1987). Le gavage induit donc une augmentation du poids du foie causée par l'accumulation des lipides au niveau des hépatocytes en conséquence à la grande quantité de glucides ingérés. En effet, à la fin de la période de gavage, le foie peut atteindre 10 fois son poids initial (Guemene et al., 2004).

Vu sa composition chimique riche en lipides (tableau 1), qui peuvent représenter jusqu'à 60% du poids total, le foie gras est considéré comme un aliment très déséquilibré du point de vue nutritionnel. Cependant, c'est aussi cette richesse en matières grasses qui confère au foie gras ses particularités organoleptiques et sensorielles et en font la raison pour laquelle le foie gras est recherché par les consommateurs. La fonte des matières grasses par contre altère et dévalorise les caractéristiques organoleptiques du foie gras.

Tableau 1 : Composition chimique (en % de la matière fraîche) des foies d'oies et de canards de barbarie ou Mulard après gavage (Salichon et al., 1994)

| Espèces | Oie landaise | Canard de Barbarie | Canard Mulard |
|--------------------------|-----------------|-----------------------|------------------|
| Poids du foie (g) | 768 ± 143 | 415 ± 74 | 677 ± 123 |
| Eau (%) | 32,7 ± 3,1 | 32,0 ± 3,4 | 28,5 ± 3,4 |
| Protéines (%) | 8,3 ± 0,9 | 7,3 ± 1,5 | 6,9 ± 1,0 |
| Minéraux (%) | 0,7 ± 0,1 | 0,9 ± 0,2 | 0,6 ± 0,1 |
| Lipides (%) | 54,6 ± 4,3 | 61,9 ± 7,4 | 60,5 ± 4,4 |

De plus d'après le décret n° 93-999 du 9 août 1993 un foie gras entier commercialisé ne peut pas contenir plus de 30% de graisses exsudées. Pour ces raisons, la fonte lipidique au cours de la cuisson des foies gras est considérée comme un facteur

important dans le déterminisme de la qualité du foie gras et peut facilement influencer la décision d'achat par le consommateur.

La fonte lipidique à la cuisson a été l'élément le plus étudié dans le foie gras ces dernières années à cause de son hétérogénéité dans le produit final. La maîtrise de la variabilité de cette fonte constitue donc un enjeu important pour la filière. De nombreux facteurs pouvant affectés ce rendement technologique ont été identifiés : la génétique joue un rôle très important car la fonte lipidique varie d'un type de palmipèdes à l'autre (Salichon et al., 1994). Dans leur étude, Blum et al. (1990) ont aussi rapporté que la fonte est proportionnelle au poids du foie. D'autres facteurs zootechniques comme le système d'élevage, la méthode de gavage et la durée du jeûne sont également connus comme pouvant influencer la fonte (Babilé, 1989 ; Baudonnet-Lenfant et al., 1991). Cependant, même en contrôlant tous ces paramètres, la variabilité du taux de fonte inter et intra-lot demeure élevée (Theron et al., 2011).

Des études menées sur l'influence du mode de préparation du foie gras sur ses qualités organoleptiques et technologiques ont aussi montré une influence significative du moment de l'éviscération sur la fonte du foie gras à la cuisson. Rousselot-Pailley et al. (1992) ont ainsi remarqué que les foies éviscérés à chaud (quelques minutes post-mortem) fondent moins que ceux éviscérés à froid (24 h post-mortem, figure1).

La texture est sans doute le premier marqueur du déterminisme de la fonte du foie gras (Goullieux et Chanut, 2006). En effet, le plus le foie est dur, plus il fond. L'étude menée par Theron et al. (2011) sur l'histologie des hépatocytes suggère aussi que la cuisson agit sur la matrice non lipidique en entraînant la coagulation de ses protéines causant ainsi la fusion des gouttelettes lipidiques et par conséquent leur exsudation. Ces résultats suggèrent aussi que des processus enzymatiques pourraient intervenir post-mortem en modifiant la structure des hépatocytes.

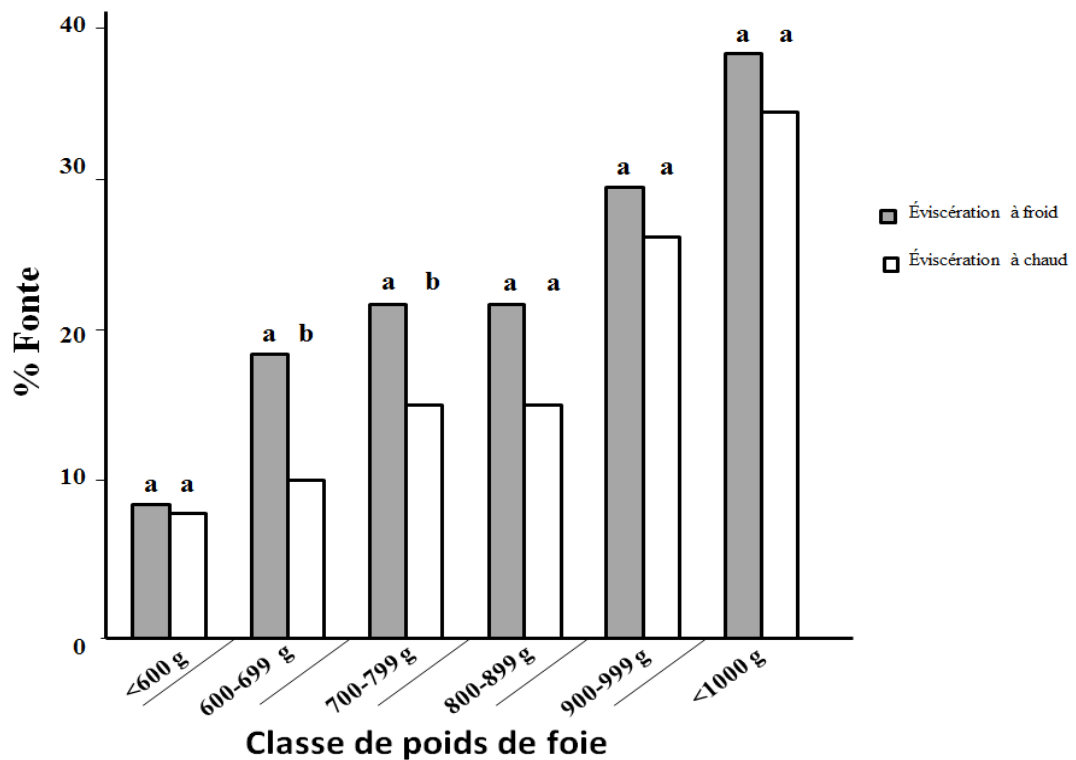


Figure 1 : Influence du mode d'éviscération sur la qualité technologique du foie gras d'oie (adaptée de Rousselot-Pailley et al., 1992)

Très peu d'études ont été menées sur le protéome du foie gras. Par contre, sa fraction lipidique a été fortement examinée sans pour autant aboutir à des résultats concluants en ce qui concerne le déterminisme de la variabilité du taux de fonte. Cette thèse porte donc sur l'étude d'une fraction du protéome hépatique (les principales protéases) et sur ses liens possibles avec la fonte lipidique des foies à la cuisson. L'étude de l'activité de ces protéases nous a semblé essentielle car d'une part des altérations des activités protéolytiques ont été enregistrées dans beaucoup d'études faites sur des foies en état de stéatose d'origine pathologique (Limaye et al., 2003 ; Iimuro et Brenner, 2008 ; Canbay et al., 2003) et d'autre part, elles sont aussi connues pour avoir un rôle primordial dans le déterminisme de la texture dans d'autres types de produits d'origine animale tel que la viande (Grossi et al., 2012 ; Martinez et al., 2011).

Dans l'étude qui a été développée au cours de ces travaux de doctorat, nous avons mené plusieurs expériences pour essayer de savoir si l'activité des protéases différait fortement entre le début et la fin du gavage dans deux types de canards, s'il était possible de moduler l'activité des protéases hépatiques à travers des régimes thermiques post-mortem variables et enfin si on pouvait relier des taux de fonte variables à des activités protéolytiques différentes. Ces trois questionnements ayant fait l'objet d'expériences indépendantes, nous les présenterons aussi de façon indépendante mais nous essaierons de les discuter de manière globale afin de mieux préciser les liens éventuels pouvant exister entre fonte des foies gras à la cuisson, et activité protéolytique post-mortem. Auparavant, nous allons présenter brièvement les principaux points connus du développement de la stéatose hépatique d'origine nutritionnelle chez les palmipèdes ainsi que les différents points connus de l'action des principales protéases hépatiques.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans cette étude bibliographique, nous présenterons d'abord quelques éléments du métabolisme hépatique des oiseaux en général. Ensuite, nous aborderons les changements hépatiques observés suite à la mise en gavage des palmipèdes à travers la mise en place progressive de la stéatose. Une troisième partie sera consacrée à l'étude de la qualité du foie gras. Enfin, les deux dernières parties de cette étude seront consacrées à l'étude de protéases hépatiques et à l'altération de leurs activités protéolytiques en lien avec des pathologies hépatiques.

1. Le métabolisme hépatique chez les oiseaux

Bien que les lipides représentent la forme majeure de réserve énergétique chez les oiseaux, ils sont peu originaires de leur alimentation. Ainsi, la principale matière première carbonée utilisée dans l'alimentation des palmipèdes est le maïs dont la composition chimique est très riche en glucides (6,1% d'amidon vs. 3,7% de matières grasses brutes ; (Sauvant et al., 2004)).

1.1. Le métabolisme glucidique

Les glucides, en particulier l'amidon, représentent le principal nutriment des palmipèdes quelle que soit la phase de production considérée (tableau 2). La digestion de l'amidon en glucose implique 3 étapes. Il est d'abord digéré en dextrines puis en maltose par les amylases pancréatiques. Le maltose est ensuite rapidement dégradé en glucose par les enzymes intestinales (maltase et isomaltase). Grâce au système porte, le glucose est absorbé puis est transféré au foie où il sera capté par un transporteur nommé GLUT2 (Wang et al., 1994).

Tableau 2 : Composition chimique d'un aliment canard gras pendant ses trois périodes d'élevage (démarrage, croissance et gavage, Chartrin et al., 2006)

| Période (semaines) | Démarrage (1 à 4) | Croissance (4 à 12) | Gavage (12 à 14) |
|---------------------------------|----------------------|------------------------|---------------------|
| Energie métabolisable (kcal/kg) | 2830 | 2850 | 3330 |
| Protéines (%) | 18,21 | 15,98 | 8,28 |
| Lipides (%) | 3,34 | 2,84 | 3,38 |
| Acides gras saturés (%) | 17,17 | 16,1 | 14,52 |
| Acides gras mono-insaturés (%) | 24,98 | 28,36 | 27,44 |
| Acides gras poly-insaturés (%) | 57,85 | 55,54 | 58,02 |

1.1.1. Glycogénèse

Le glucose est essentiel pour la production d'énergie sous forme d'ATP. Cependant, lors d'une glycémie élevée il est stocké sous forme de glycogène par la voie de la glycogénogenèse (figure 2). Le glucose est activé en glucose-6-phosphate, par une hexokinase, puis sera ensuite converti en glucose-1-phosphate puis en UDP-glucose sous l'action de la phospho-glucomutase et de la glucose-1-phosphate uridylyltransférase (UDP-glucose pyrophosphorylase) respectivement. La glycogène synthase transformera l'UDP-glucose en glycogène en permettant son allongement progressif.

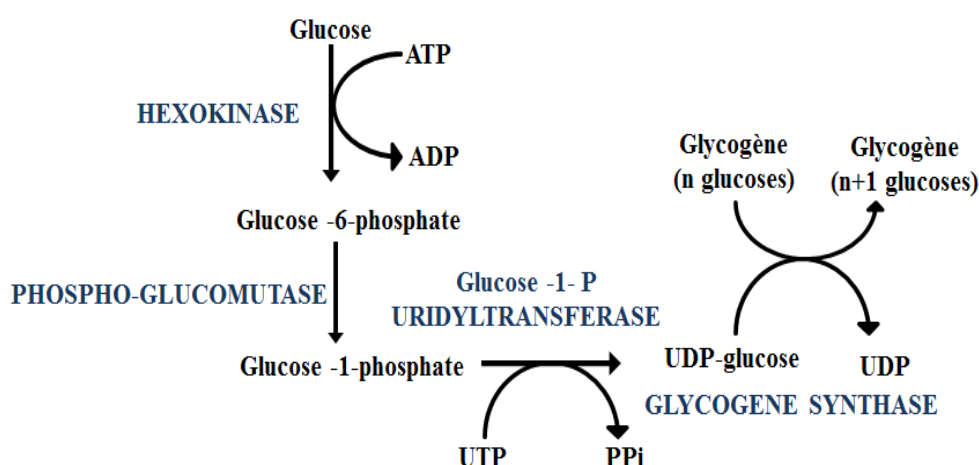


Figure 2 : Synthèse du glycogène par la voie de la glycogénogenèse. (Adaptée de http://www.nbs.csudh.edu/chemistry/faculty/nsturm/CHE452/04_Glycogen.htm)

La glycogénèse est contrôlée par l'hormone glucagon qui entraîne une augmentation de la concentration cellulaire en AMPc, aboutissant ainsi à la phosphorylation de la glycogène synthase. Quand la glycogène synthase est phosphorylée, elle devient peu active et l'allongement du glycogène s'arrête. En période de jeûne, la glycémie baisse, le glycogène peut être donc être réactivé par la voie de la glycolyse.

1.1.2. Utilisation de glucose

Grâce à la voie de la glycolyse aérobie, les cellules hépatiques sont capables d'utiliser le glucose pour produire de l'énergie sous la forme d'ATP. Pour permettre son entrée dans les voies métaboliques, le glucose est d'abord phosphorylé, sous l'action de la glucose-6-phosphatase, en glucose-6-phosphate. La glycolyse permet, après une succession de réactions, de fournir deux molécules de pyruvate et deux molécules d'ATP à partir d'une molécule de glucose (Figure 3).

Le pyruvate passe du cytoplasme dans la mitochondrie où il sera transformé par la pyruvate déshydrogénase en acétyl-CoA qui va entrer dans le cycle de Krebs (Figure 4). Une cascade de réactions conduit alors à la production de CO₂ et de NADH qui sera utilisé pour fournir de l'ATP dans la chaîne respiratoire.

Les cellules hépatiques peuvent aussi utiliser le glucose pour la synthèse des acides gras et des lipides. Cette aptitude est plus importante chez les oiseaux (Saadoun et Leclercq, 1987) que chez d'autres espèces comme le porc ou les ruminants dont le site majeur de la lipogenèse *de novo* se situe dans les tissus adipeux (Hanson et Ballard, 1967 ; Mourot et Kouba, 1999). Ainsi, le foie est responsable de plus de 70% de la lipogenèse endogène chez les oiseaux (Saadoun et Leclercq, 1987).

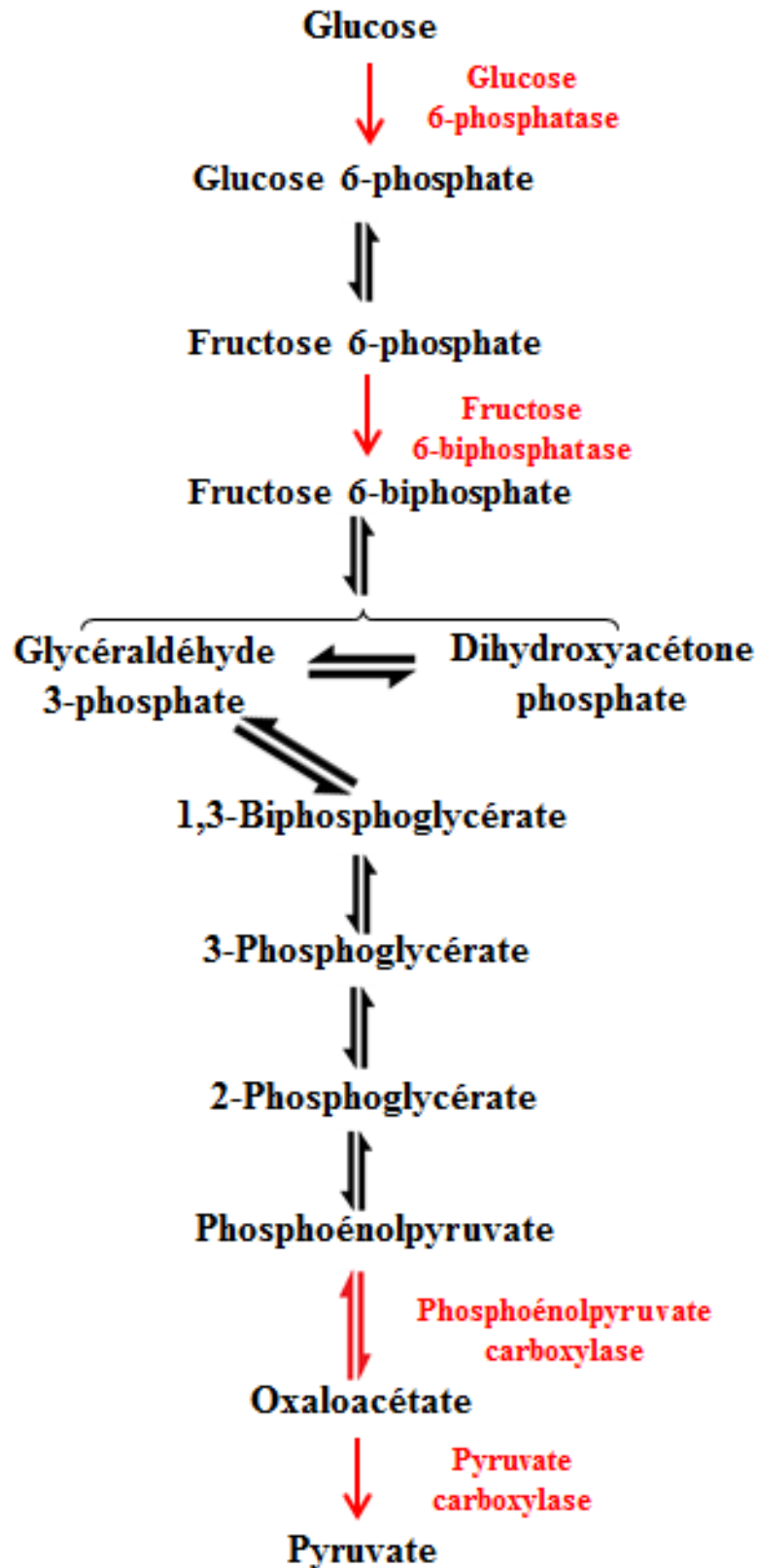


Figure 3 : Principales étapes de la glycolyse. (Adapté de http://biologie.univ-mrs.fr/upload/p222/05_GluconeogeneseL3BioCell.pdf)

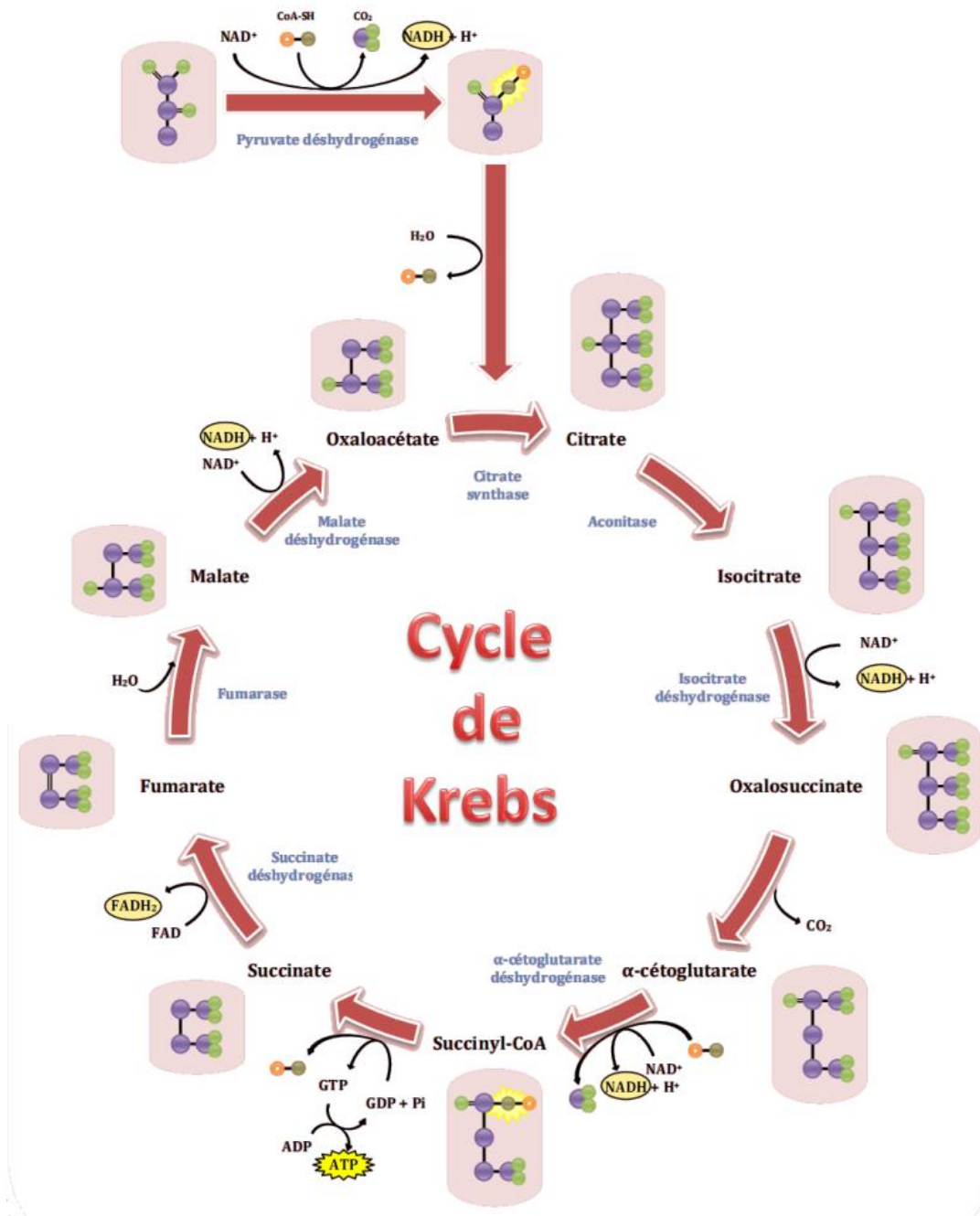


Figure 4 : Réactions enzymatiques du cycle de Krebs
(Adapté de <http://www.cours-pharmacie.com/images/Cycle-krebs.png>)

1.2. Le métabolisme lipidique

Les lipides jouent un rôle primordial en tant que réserve énergétique. La couverture des besoins de l'organisme en lipides est assurée en faible partie par les apports en lipides alimentaires. Celle-ci dépend donc surtout de la lipogenèse effectuée

à partir des résidus acétates fournis par le catabolisme lipidique. Chez les oiseaux, c'est au niveau des hépatocytes que se produit l'essentiel de la lipogenèse (Saadoun et Leclercq, 1987). Les lipides sont ensuite exportés aux tissus extra-hépatiques sous forme de lipoprotéines par la voie plasmatique.

1.2.1. Utilisation des lipides alimentaires

Contrairement aux glucides, les lipides contribuent peu à la formulation des aliments des palmipèdes (3.7% de matières grasses brutes). Les triglycérides, forme majoritaire mais non-absorbable des lipides alimentaires, sont hydrolysés par les lipases en mono- et diglycérides, acides gras et glycérol. Des micelles résultant de l'association des acides gras libres et des monoglycérides avec le cholestérol et les sels biliaires sont constituées, afin d'être absorbées au niveau de l'intestin. Les acides gras à courte chaîne sont absorbés par le système lymphatique, associés à l'albumine sérique puis transportés jusqu'au foie. Au contraire, les acides gras à longue chaîne, après ré-estérification en triglycérides dans la muqueuse intestinale, s'associent à des phospholipides, du cholestérol, des esters de cholestérol et d'apoprotéines puis ils seront secrétés sous forme de portomicrons qui circulent par la veine porte jusqu'au foie.

1.2.2. Synthèse des acides gras de novo

Les capacités de synthèse de novo des acides gras sont extrêmement limitées dans les tissus périphériques chez les oiseaux par rapport aux mammifères (Leveille et al., 1975). Chez le canard, 75% du glucose entrant dans les hépatocytes est transformé en acides gras (Evans, 1972). La synthèse des acides gras requiert la production d'acétyl-

CoA à partir du glucose. Sous l'action de l'acétyl-CoA-carboxylase, l'acétyl-CoA est converti en malonyl-CoA en présence de bicarbonate et d'ATP. L'acide gras synthétase, catalyse ensuite la formation des chaînes carbonées en utilisant l'acétyl-CoA et le malonyl-CoA, afin d'obtenir des acides gras à 16 atomes de carbone (acide palmitique).

La lipogenèse est contrôlée par le rapport de deux hormones i.e. l'insuline et le glucagon. La première active l'acétyl-CoA-carboxylase et donc stimule la lipogenèse. La deuxième inhibe l'acétyl-CoA et par conséquent la lipogenèse. Leur ratio plasmatique dépend fortement de l'état nutritionnel des animaux.

L'élongase et la désaturase assurent la synthèse de l'ensemble des acides gras longs, saturés, mono- ou poly-saturés qui pourront être estérifiés sous forme de triglycérides, de phospholipides ou d'esters de cholestérol. Il existe 4 types de désaturases appelées $\Delta 9$, $\Delta 6$, $\Delta 5$ et $\Delta 4$. La désaturase $\Delta 9$ agit sur les acides gras saturés, où elle produit une désaturation entre les carbones 9 et 10 à partir de l'extrémité carboxyle de la chaîne. Associées aux élongases, les autres désaturases interviennent ultérieurement pour introduire des désaturations du côté de l'extrémité carboxylique.

1.2.2.1. Synthèse des glycérides, des phospholipides et du cholestérol

Les triglycérides qui représente près de 95% des lipides dans le foie gras, proviennent principalement de la lipogenèse et en très faible proportion de l'alimentation. Les triglycérides, lipides de réserve, sont formés à partir du glycérol-3-phosphate issue de la dégradation de glucose. Le glycérol-3-phosphate subit deux acylations par la glycérol phosphate acyltransférase qui va fixer deux acides gras à longue chaîne en position 1 et 2 par estérification. L'acide phosphatique qui en résulte sera hydrolysé en 1,2-diglycérides par l'action de la phosphatidate phosphatase. La

formation de triglycérides se fait ensuite par la fixation d'un troisième acide gras par une acylation en position 3.

Les phospholipides sont synthétisés à partir d'acétyl-coenzyme A et de glycérol-3-phosphate. Les premières étapes de synthèse des phospholipides sont communes avec celles des triglycérides jusqu'à l'intermédiaire acide phosphatidique ou 1,2-diglycéride. Les phospholipides majeurs des structures cellulaires sont la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylcholine (PC). La PC est le constituant le plus important dans les membranes et est essentiellement obtenue par la méthylation de la PE.

Le cholestérol est un constituant majeur de membranes cellulaires animales. Il constitue un précurseur des sels biliaires et des hormones stéroïdes. Il peut être synthétisé par le foie et l'intestin, ou apporté par des lipoprotéines. La synthèse du cholestérol s'effectue dans le cytoplasme et implique de nombreuses réactions enzymatiques à partir de l'hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA). Ce dernier, résultant de la condensation de 3 acétyl-CoA, est transformé en mévalonate par l'HMG-CoA réductase (Figure 5).

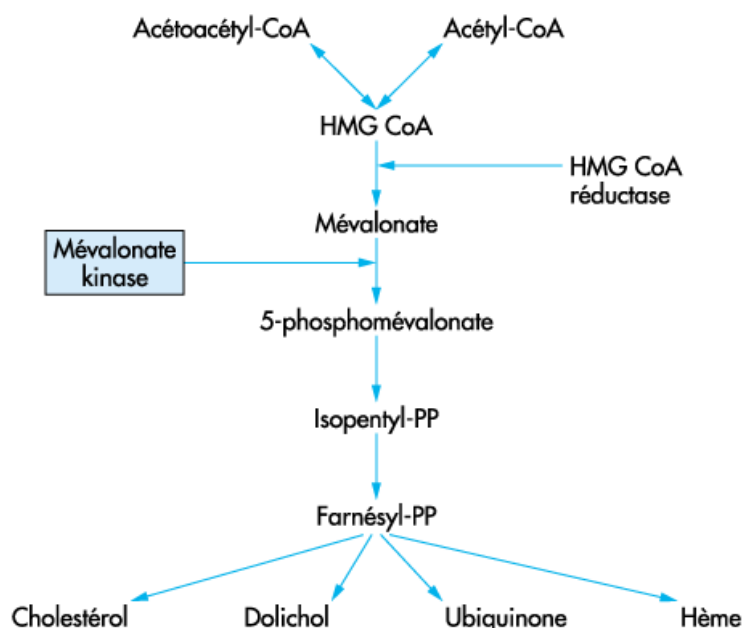


Figure 5 : Voie de synthèse du cholestérol
(http://www.jle.com/e-docs/00/02/BF/29/texte_alt_fig3.gif)

Cette enzyme est sujette à de nombreux contrôles, dont le plus important est un rétrocontrôle négatif par le cholestérol.

1.2.3. L'exportation des lipides

Les lipides circulent dans l'organisme sous la forme de lipoprotéines. Les lipoprotéines sont constituées d'un noyau apolaire de triglycérides et d'esters de cholestérol entourés d'une couche de phospholipides et de cholestérol avec des protéines ou des apoprotéines intégrées dans la structure lipidique. Chez les oiseaux, on distingue 5 catégories de lipoprotéines, en se basant sur leur densité après ultracentrifugation : les portomicrons, les VLDL, les IDL, les LDL et les HDL. Les portomicrons, sécrétés par les entérocytes, assurent le transport des acides gras à longue chaîne et du glycérol de l'intestin vers les tissus périphériques. Les VLDL (very low density lipoprotein) ou lipoprotéines de très faible densité sont sécrétées par le foie. Elles ont pour rôle de transporter les acides gras du foie vers les tissus périphériques. Les IDL (intermediate density lipoprotein) ou lipoprotéines de densité intermédiaire, sont issues de la dégradation des VLDL. Les LDL (low density lipoprotein) ou lipoprotéines de faible densité sont sécrétées par le foie. Les IDL et les LDL sont des transporteurs du cholestérol. Les HDL (high density lipoprotein) ou lipoprotéines à densité élevée sont aussi sécrétées par le foie et sont riches en cholestérol et en protéines mais pauvres en triglycérides. Les HDL ont comme fonction le transport et le re-captage du cholestérol du et vers le foie.

1.3. Le métabolisme des protéines

Le rôle du foie dans le métabolisme des protéines est probablement la plus importante de ses fonctions métaboliques. Les hépatocytes sont en effet responsables de la synthèse de la plupart des protéines plasmatiques (figure 6). Par exemple, l'albumine est synthétisée presque exclusivement par le foie. En outre, le foie est essentiel pour l'élimination de l'ammoniaque par la voie de synthèse de l'urée. Les autres principales protéines plasmatiques synthétisées par le foie sont les composants de la cascade de coagulation (fibrinogène et la prothrombine), et les protéines impliquées dans le transport du fer (transferrine, l'haptoglobine, et hémopexine) (Charlton, 1996 ; Rhoades et Bell, 2013)

Le foie est aussi le principal site du métabolisme des acides aminés, qui englobe d'une part la dégradation et transformation des acides aminés en glucose ou en lipides par désamination ou transamination et d'autre part la synthèse d'un grand nombre de protéines biologiquement essentielles. Si les acides aminés essentiels doivent être fournis par l'alimentation, le foie peut créer des acides aminés non essentiels à partir des acides aminés essentiels. Par exemple, la tyrosine peut être synthétisée à partir de la phénylalanine, et la cystéine peut être synthétisée à partir de la méthionine (Rhoades et Bell, 2013).

Le foie orchestre le métabolisme des protéines et des acides aminés. Lorsque le foie est malade, la régulation du métabolisme des protéines est souvent perturbée. Les manifestations d'un métabolisme des protéines perturbé dans les pathologies du foie sont variées et changent avec l'étiologie de la maladie et sa gravité (Charlton, 1996).

La protéolyse, ainsi que la protéosynthèse, sont des processus importants qui contribuent au renouvellement des protéines. Toutefois, le mécanisme de la protéolyse est beaucoup moins bien compris que celui de la protéosynthèse (Kadowaki et Kanazawa, 2003). La principale raison en est que, contrairement à la protéosynthèse, on

a toujours pas développé une méthode simple et précise pour étudier la protéolyse *in vivo*. Les principales enzymes protéolytiques hépatiques seront étudiées en détails dans la partie 5 de cette étude bibliographique.

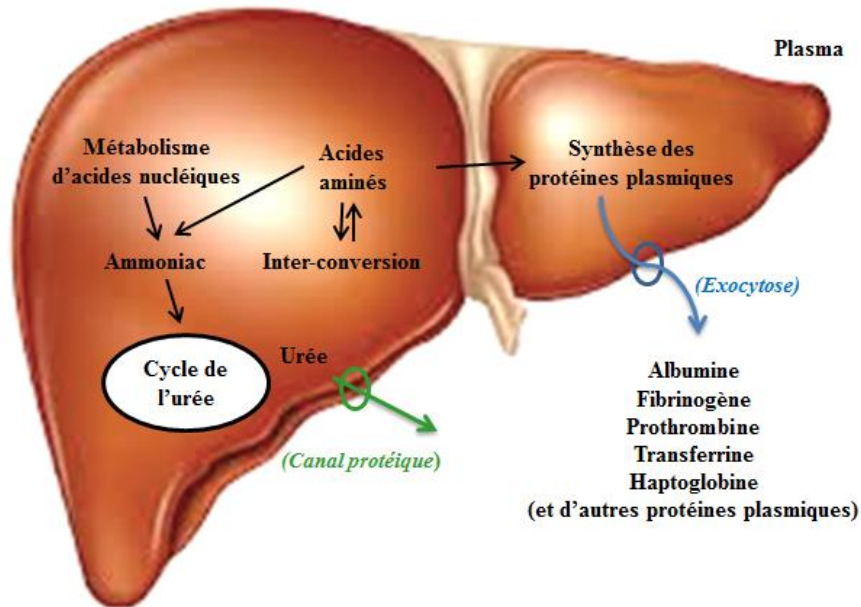


Figure 6 : Le métabolisme hépatique des protéines (<https://www.inkling.com/read/medical-physiology-rodney-rhoades-david-bell-4th/chapter-27/protein-and-amino-acid>)

Conclusion :

Chez les oiseaux, comme chez les mammifères, les lipides jouent un rôle essentiel en tant que réserves énergétiques. Contrairement à de nombreux mammifères chez lesquels la synthèse des lipides *de novo* se déroule principalement dans les tissus périphériques, la lipogenèse *de novo* chez les oiseaux est assurée par le foie. La couverture des besoins lipidiques peut être assurée par l'alimentation mais aussi principalement par la lipogenèse endogène dont le substrat de départ est l'acétyl-CoA fourni essentiellement par la glycolyse. Les lipides sont en grande parties véhiculés dans l'organisme sous forme de lipoprotéines. Un déséquilibre entre le taux de formation et de sortie de lipides conduit à leur accumulation dans le foie et au développement de la stéatose hépatique.

2. La stéatose hépatique

La stéatose hépatique se définit par l'accumulation de graisses, essentiellement sous la forme de triglycérides, dans les cellules du foie et résulte d'un déséquilibre entre la synthèse et l'exportation des lipides. Chez les mammifères, il s'agit d'un état pathologique qui résulte d'une malnutrition, d'une carence en protéines ou d'un dysfonctionnement enzymatique. Elle peut aussi être causée par des facteurs génétiques (Hooper et al., 2011), les médicaments (Grieco et al., 2005) ou l'abus d'alcool (Lieber et al., 1989). Dans la plupart des cas, elle est associée à d'autres maladies comme l'obésité (Fabbrini et al., 2010) et/ou l'insulino-résistance (Lingvay et al., 2007). Les sujets atteints peuvent présenter différents états histopathologiques selon le stade de la maladie (Figure 7). La stéatose hépatique est connue pour être un précurseur de la stéatohépatite qui peut évoluer en cirrhose, fibrose voire en cancer primaire du foie (Baffy et al., 2012a).

Chez les oiseaux, cependant, il faut distinguer la stéatose pathologique de celle qui se produit naturellement chez certaines espèces d'oiseaux migratrices comme chez l'oie grise des landes (*Anser anser*) ou le canard (*Anas platyrhynchos*). La stéatose hépatique chez les palmipèdes survient spontanément, associée à une hyperphagie pré-migratoire, en vue d'un stockage d'énergie avant la migration. Depuis l'Égypte antique cette capacité à stocker de grandes quantités de lipides dans les tissus adipeux et le foie a été exploitée par l'homme pour produire des "foies gras" (Figure 8).

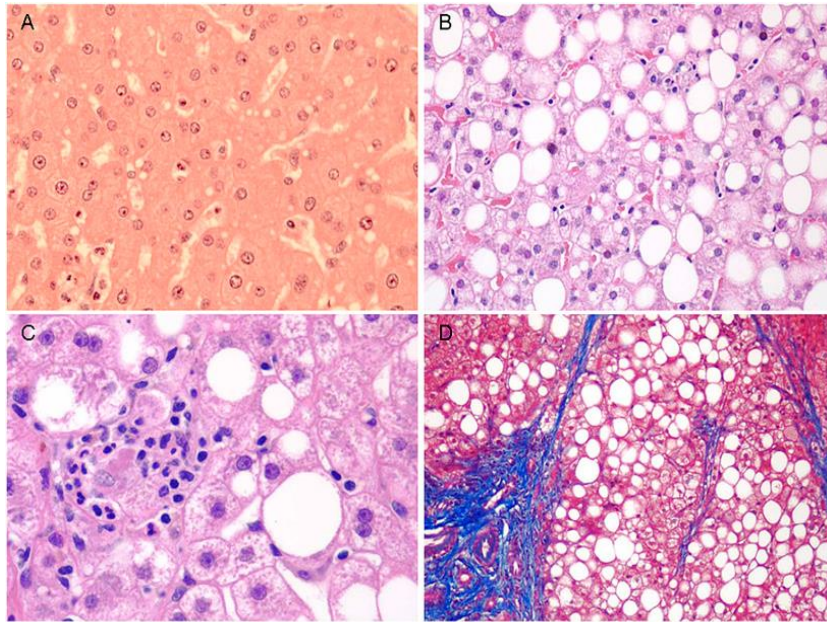


Figure 7 : la progression histopathologique de la stéatose non-alcoolique. A : foie normal. B : stéatose macro-vésiculaire. C : Neutrophiles entourant les corps de Mallory D : stéatose avec des nodules cirrhotiques. (Hopper et al. 2011).



Figure 8 : Ancien bas-relief représentant des égyptiens nourrissant des canards avec des figes. (http://www.avis-bg.com/club_gourmet.html?fb_577114_anch=577115)

La réversibilité de la stéatose hépatique chez les palmipèdes gavés a été démontrée pour prouver l'origine non pathologique de cet état physiologique particulier. Contrairement à la stéatose d'origine pathologique, la stéatose chez les palmipèdes n'induit pas de lésions au niveau histologiques (Blum et al., 1990). Ainsi, à l'arrêt du

gavage, le poids du foie ainsi que sa composition chimique retrouvent leurs valeurs normales. Les palmipèdes développent, à l'arrêt du gavage, une évolution symétrique à celle du gavage (Babilé et al., 1996, 1998). Quatre semaines après l'arrêt du gavage, les caractéristiques histologiques du foie et ses paramètres physiologiques retournent aux valeurs d'avant le gavage (Babilé et al., 1996).

Le gavage, avec une ration riche en carbohydrates, induit une forte augmentation du poids de foie pour atteindre près de 10% de la masse corporelle au bout de deux semaines (Hermier et al., 1994). La stéatose induit ainsi des modifications histologiques, biochimiques et métaboliques importantes sur l'ensemble des tissus et organes chez les palmipèdes. Les modifications associées à la stéatose ont été largement étudiées et sont variables en fonction de l'origine génétique des palmipèdes.

La composition chimique du foie évolue avec le gavage. La cinétique de l'évolution pendant le gavage (à 0, 3, 6, 9, et 12 jours), a été étudiée exhaustivement par Baudonnet, (1993) chez le canard de Barbarie. En réponse à la surcharge alimentaire, le foie accumule les triglycérides et le poids de foie est multiplié par 2,5 dès les premiers jours (Baudonnet, 1993, Tableau 3). Cet accroissement pondéral est aussi relié à l'augmentation des taux de protéines, de phospholipides et de cholestérol. La teneur en eau augmente aussi pour maintenir la pression osmotique en relation avec l'accumulation de sucres en début de gavage, pour se stabiliser dans les jours qui suivent, avant de remonter à la fin de la période de gavage. A ce stade, trois acides gras montrent une importante augmentation i.e. l'acide oléique, l'acide palmitique et l'acide palmitoléique.

Tableau 3 : Evolution de la composition biochimique et du profil des acides gras du foie au cours du gavage (Baudonnet, 1993)

| | MEG | Stades de gavage | | | | S ⁽¹⁾ | |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|-----------|
| | | 3 jours | 6 jours | 9 jours | 12 jours | gavés | gavés/MEG |
| Effectifs | (9) | (9) | (9) | (9) | (11) | S | S |
| Foie (g) | 101,2 ^a | 244,9 ^b | 29 ^c | 385,6 ^d | 535,0 ^e | *** | *** |
| Composition (g) | | | | | | | |
| Humidité | 69,0 ^a | 144,5 ^b | 129,9 ^b | 145,5 ^b | 168,0 ^c | ** | *** |
| Cendres | 1,3 ^a | 2,1 ^b | 1,8 ^b | 1,9 ^b | 2,7 ^c | * | *** |
| Protéines | 16,6 ^a | 23,0 ^b | 23,9 ^b | 24,9 ^b | 29,7 ^c | *** | *** |
| Autres constituants | 11,3 ^a | 33,9 ^c | 24,7 ^b | 30,4 ^{bc} | 23,2 ^b | (*) | *** |
| Lipides totaux | 3,1 ^a | 41,6 ^b | 115,6 ^c | 183,1 ^d | 311,4 ^c | *** | *** |
| Acides gras | 0,2 ^a | 0,8 ^b | 0,8 ^b | 2,3 ^c | 7,2 ^d | *** | *** |
| Monoglycérides | 0,2 ^a | 0,6 ^a | 0,4 ^a | 0,2 ^a | 3,0 ^b | ** | *** |
| Diglycérides + CE ⁽²⁾ | 0,3 ^a | 1,1 ^c | 0,6 ^b | 0,8 ^b | 1,5 ^d | *** | *** |
| Triglycérides | 0,9 ^a | 32,0 ^b | 98,4 ^c | 163,2 ^d | 281,1 ^c | *** | *** |
| Cholestérol libre | 0,02 ^a | 0,3 ^b | 1,7 ^c | 2,3 ^d | 3,3 ^c | *** | *** |
| Phospholipides | 1,5 ^a | 6,7 ^b | 13,8 ^c | 14,3 ^c | 15,4 ^c | ** | *** |
| Acides gras (%) | | | | | | | |
| Ac. Laurique (C12:0) | trace ^a | 0,06 ^b | 0,06 ^b | 0,07 ^{bc} | 0,08 ^c | ** | *** |
| Ac. Myristique (C14:0) | 0,43 ^a | 1,32 ^b | 1,60 ^c | 1,54 ^c | 1,52 ^c | * | *** |
| Ac. Myristoléique (C14:1) | 0,13 ^a | 0,22 ^b | 0,25 ^b | 0,18 ^{ab} | 0,21 ^b | ns | ** |
| Ac. Palmitique (C16:0) | 32,65 ^b | 38,82 ^c | 31,66 ^b | 31,69 ^b | 29,73 ^a | *** | *** |
| Ac. palmitoléique (C16:1) | 1,24 ^a | 7,64 ^c | 5,41 ^b | 4,72 ^b | 4,59 ^b | *** | *** |
| Ac. Margarique (C17:0) | 0,17 ^c | 0,05 ^b | trace ^a | trace ^a | trace ^a | ** | *** |
| Ac. Stéarique (C18:0) | 22,18 ^c | 8,99 ^a | 15,18 ^b | 15,80 ^b | 15,52 ^b | *** | *** |
| Ac. Oléique (C18:1) | 22,10 ^a | 39,94 ^b | 42,85 ^c | 43,42 ^c | 45,74 ^d | *** | *** |
| Ac. Linoléique (C18:2) | 19,84 ^d | 2,85 ^c | 1,93 ^b | 1,65 ^b | 1,44 ^a | *** | *** |
| Ac. Linoléinique (C18:3) | 0,54 ^c | 0,06 ^a | 0,09 ^{ab} | 0,08 ^{ab} | 0,11 ^b | * | *** |
| Ac. Arachidique (C20:0) | 0,24 ^{bc} | 0,07 ^a | 0,23 ^c | 0,13 ^{ab} | 0,20 ^{bc} | ** | *** |
| Ac. Gadoléique (C20:1) | trace ^a | trace ^a | 0,73 ^b | 0,70 ^b | 0,86 ^c | *** | *** |

(1) Signification statistique : ***P<0.001 ; **P<0.01 ; *P<0.05 ; (*)P<0.1 ; ns : différence non significative.

Sur la même ligne, les moyennes affectées du même exposant ne sont pas différentes entre elles (P<0.05). Trace <0.05%

(2) Fraction représentant les diglycérides et le cholestérol estérifié.

En revanche les pourcentages d'acide stéarique, linoléique et linolénique sont diminués. A partir du 6^{ème} jour, et inversement à la teneur en acide stéarique qui remonte puis se stabilise, les proportions d'acide palmitique et d'acide palmitoléique diminuent avant de se stabiliser. Ces résultats montrent que le foie passe par une phase d'adaptation avant l'activation complète de la lipogenèse. L'accumulation de l'acide palmitoléique, puis de l'acide oléique aux dépens de l'acide stéarique suggère une activation plus précoce de la désaturase $\Delta 9$ par rapport à celle des élongases.

Pendant cette phase d'adaptation, l'accumulation des sucres signifie que la conversion des glucides en lipides n'est pas encore suffisante. Au-delà de cette phase, la capacité du foie à transporter les lipides aux tissus périphérique augmente. Les lipides s'accumulent dans les tissus adipeux et l'augmentation des triglycérides continue au dépend des glucides. A la fin de la période de gavage, la teneur en eau atteint 30% vs 70% avant gavage. Le pourcentage de protéines passe de 16-22% à 6-8% après le gavage. Les teneurs en lipides augmentent de 5% à plus de 50% du poids de foie après le gavage dont 95% de triglycérides (Fournier et al., 1997 ; Hermier et al., 2003 ; Baudonnet, 1993).

Les hépatocytes sont normalement caractérisées par une petite taille, un noyau centré et un cytoplasme sans inclusions lipidiques. Les observations histologiques montrent des modifications importantes des hépatocytes suite au gavage. Dès les premiers jours, une augmentation de la taille des cellules est observable accompagnée par l'apparition de quelques gouttelettes lipidiques. Rapidement, le nombre de gouttelettes lipidiques augmente causant ainsi le déplacement du noyau à la périphérie de la cellule. A mi-gavage, les inclusions lipidiques présentent 10% de la surface cellulaires. A la fin de la période de gavage, quelques ruptures membranaires peuvent être observées (Bénard et Labie, 1998).

L'aptitude au gavage qui conduit à des degrés divers d'évolution de la stéatose varie non seulement selon les espèces (canards vs oies par exemple), mais aussi au sein d'une même

espèce, entre les races (Liu et al., 2006 ; Chartrin et al., 2006). Ainsi certaines races sont connues comme stockant préférentiellement les lipides dans le tissu adipeux, comme le canard Pékin par exemple, alors que d'autres, comme le canard de Barbarie, stockent préférentiellement les lipides dans leurs hépatocytes (Davail et al., 2003 ; Hermier et al., 2003). Le canard mulard issu d'un croisement entre un mâle Barbarie et une femelle Pékin présente une aptitude de développement de la stéatose supérieure à celle du canard hinny issu du croisement réciproque (Chartrin et al., 2006 ; Baéza et al., 2005). Des différences sont aussi observables chez les oies. L'oie landaise présente une plus forte aptitude à produire du foie par rapport à l'oie polonaise (Fournier et al., 1997 ; Davail et al., 2000). De ce fait, le canard de Barbarie, le mulard et l'oie landaise sont les plus utilisés pour la production de foie gras

2.1. Mécanismes de la stéatose hépatique chez les palmipèdes

L'apport massif de glucides lors du gavage déclenche la lipogenèse hépatique *de novo*. Malgré l'augmentation des lipoprotéines sécrétées, celle-ci est insuffisante pour inhiber la mise en place de la stéatose. Un déséquilibre se crée donc entre la synthèse et l'exportation des triglycérides et conduit à leur accumulation au niveau hépatique. Cependant, tous les palmipèdes ne répondent pas de la même manière au gavage alimentaire et certaines souches semblent résister à la stéatose. Un tel exemple est l'oie polonaise, chez qui l'engraissement périphérique est plus prononcé contrairement à l'oie landaise qui a elle une plus forte aptitude à la stéatose. Cette différence réside principalement dans le fait que l'oie landaise présente un défaut d'incorporation des triglycérides dans les VLDL et a par conséquent une exportation lipidique hépatique limitée par la voie plasmique (Hermier et al., 1991). En réponse au gavage

l'oie polonaise présente des teneurs en VLDL, HDL et acides gras polyinsaturés et un rapport PC/PE plus élevés que l'oie landaise (Hermier et al., 1991 ; Fournier et al., 1997). De même, le canard Pékin, dont l'engraissement est plutôt périphérique, présente des teneurs en lipides et en lipoprotéines plasmatiques plus élevées que celles du canard de Barbarie qui est lui connu pour avoir une bonne aptitude à la stéatose (Hermier et al., 2003). L'activité de l'enzyme malique est un autre facteur qui pourrait jouer sur l'aptitude au gavage. En fait, cette enzyme est responsable de la fourniture du NADPH qui est nécessaire à la voie de synthèse des acides gras. L'oie landaise présente une activité de l'enzyme malique plus importante comparée à celle de l'oie polonaise et donc une plus forte lipogénèse (Mourot et al., 2000). Une autre enzyme, la lipoprotéine lipase, ou LPL, peut affecter le site de stockage de lipides et par conséquent l'aptitude à la stéatose. La forte activité de la LPL favorise le dépôt des lipides dans les adipocytes. En revanche une faible activité assure le retour des VLDL non catabolisées vers le foie où elles seront stockées ultérieurement (Davail et al., 2000). Des études ont montré que l'activité de cette enzyme est plus faible chez les souches ayant une bonne aptitude à la stéatose, comme l'oie landaise et le canard de Barbarie, en comparaison avec celles ayant de plus faibles aptitudes comme chez le canard Pékin et l'oie polonaise (Davail et al., 2000, 2003).

Conclusion :

L'aptitude à la stéatose chez les palmipèdes dépend de l'équilibre entre stockage et exportation des lipides hépatiques. Cet aptitude est variable selon le génotype et semble être régulée par une combinaison de plusieurs mécanismes enzymatiques et hormonaux. La régulation repose principalement sur trois voies, i.e. la lipogénèse à travers l'activité de l'enzyme malique, la sécrétion des lipides à travers les lipoprotéines et finalement du site de dépôt des lipides à travers l'activité de la LPL.

3. Qualité du foie gras

Telle que définie par l'Organisation Internationale de Normalisation la qualité est « l'ensemble des propriétés caractéristiques d'un service ou d'un produit qui lui confère l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés et implicites de tous les utilisateurs» (ISO 8402: 1994) ». Selon le niveau de satisfaction, un produit peut être qualifié comme ayant une excellente, bonne ou mauvaise qualité.

Les caractéristiques définissant la qualité d'un produit alimentaire peuvent être classées comme suit:

- La **valeur nutritionnelle** concerne les apports en différents niveaux de nutriments (protéines, lipides, sucres, vitamines, etc.).
- La **qualité sensorielle** concerne ce qui peut être perçu par les organes des sens (couleur, aspect, texture, goût, odeur, etc.)
- La **qualité technologique** concerne l'aptitude de l'aliment à subir des transformations (stockage, capacité de rétention en eau, rendement après une transformation donnée, etc.)
- La **qualité sanitaire** concerne l'absence de tout danger (physique, chimique ou biologique) pour la santé des consommateurs.
- La **qualité psychosociale** concerne la façon dont le produit est subjectivement apprécié par les consommateurs (c'est souvent un caractère culturel).

Toutes ces caractéristiques de qualité d'un produit alimentaire peuvent être influencées par des paramètres intrinsèques (génétique, âge, alimentation, conditions d'élevage, etc.) liés à l'animal ou bien par des facteurs extrinsèques (température, durée de conservation, environnement du produit, etc.).

3.1. Les composants de la qualité du foie gras

Un foie gras de bonne qualité doit présenter les caractéristiques suivantes:

Selon la loi :

- Les foies doivent avoir un poids net d'au moins 250 g pour les canards et 400 g pour les oies.
- Les exsudats ne doivent pas dépasser 30% du poids de foie transformé pour les foies gras et foies gras entiers.

Qualités sensorielles :

- La couleur doit être claire et uniforme sans lésions ou traces de sang visible. Un foie gras d'oie a un ton rose clair tandis que celui de canards a un ton plutôt jaunâtre (Robin et al., 2004).
- La texture du foie gras doit être ferme sans être dure, lisse mais pas malléable. La texture doit être régulière et fine.(Cazeils et al., 1999)
- Le goût de foie gras de canard est prononcé avec une consonance rustique tandis que celui de l'oie est léger et délicat (Rousset-Akrim et al., 1994).

Il existe trois types commerciaux de foie gras ; le foie gras entier, le foie gras et le bloc de foie gras (figure 9). Le **foie gras entier** est formé d'un ou de plusieurs lobes de foie gras et d'un assaisonnement. Il ne peut comporter plus de 30% de graisse exsudée. Le foie gras entier représente la forme de commercialisation ayant la plus forte valeur économique. La dénomination **foie gras** est donnée à une préparation composée de morceaux de lobes de foie gras agglomérés et assaisonnés. Comme le foie gras entier, le taux de fonte du foie gras ne doit pas dépasser les 30%. On appelle **bloc de foie gras** la préparation composée de foie gras reconstitués et d'un assaisonnement. La quantité d'eau ajoutée et apportée par les

assaisonnements ne doit pas excéder 10% de la masse de la préparation (décret n ° 93-999 du 9 Août, 1993, publiée au « Journal officiel de la République française » sur les préparations à base de foie gras).



Figure 9 : Les 3 formes commerciales de foie gras : foie gras entier, foie gras et bloc de foie gras

Bien que le foie gras puisse être vendu cru, il ne se garde pas longtemps dans cet état. Le foie gras est donc souvent commercialisé cuit ou mi-cuit afin de prolonger sa durée de vie. Le foie gras **mi-cuit** est pasteurisé à moins de 100°C par cuisson à cœur et se conserve plusieurs mois au réfrigérateur en conservant tous les arômes du produit frais. Le foie gras **cuit** l'est par stérilisation en autoclave à plus de 100°C et peut être ainsi conservé pendant plusieurs années dans un milieu frais et sec.

3.2. Le rendement technologique après cuisson

La fonte des lipides représente le principal problème de qualité pour les producteurs ainsi que pour les consommateurs de foie gras. Ce phénomène résulte d'une exsudation excessive de lipides et peut se produire aux différents stades du traitement thermique de pasteurisation ou de

stérilisation. Il s'agit d'un aspect essentiel, responsable de l'altération de nombreuses caractéristiques organoleptiques du produit final, comme le goût et la texture. Pour ces raisons, et afin de protéger le consommateur, le taux de fonte est réglementé par la loi (décret n ° 93-999 du 9 Août, 1993, publiée au " Journal officiel de la République française »).

Cependant, malgré les efforts déployés par les industriels pour contrôler la perte de graisse, la variabilité du rendement de cuisson du foie gras peut rester élevée et pénaliser plus ou moins l'industrie alimentaire. L'uniformité du produit est en effet un des aspects les plus importants pour les industriels comme il l'est également important pour le consommateur. Afin d'estimer la perte de graisse au cours du chauffage des foies gras de nombreuses techniques existent telles que le test en verrine, le test en pilulier, le test en poche, etc. Néanmoins l'échantillonnage, le poids de l'échantillon et les différents protocoles d'analyse utilisés peuvent créer beaucoup de différences et expliquent l'incompatibilité des différents tests (Baudonnet, 1993).

3.3. Les paramètres influençant le rendement technologique

De nombreux paramètres ont été identifiés comme ayant un effet sur le rendement technologique des foies gras cuits ou mi-cuits. Ces paramètres peuvent être biologiques ou technologiques et concerner le péri - ou le post- mortem (Figure 10)

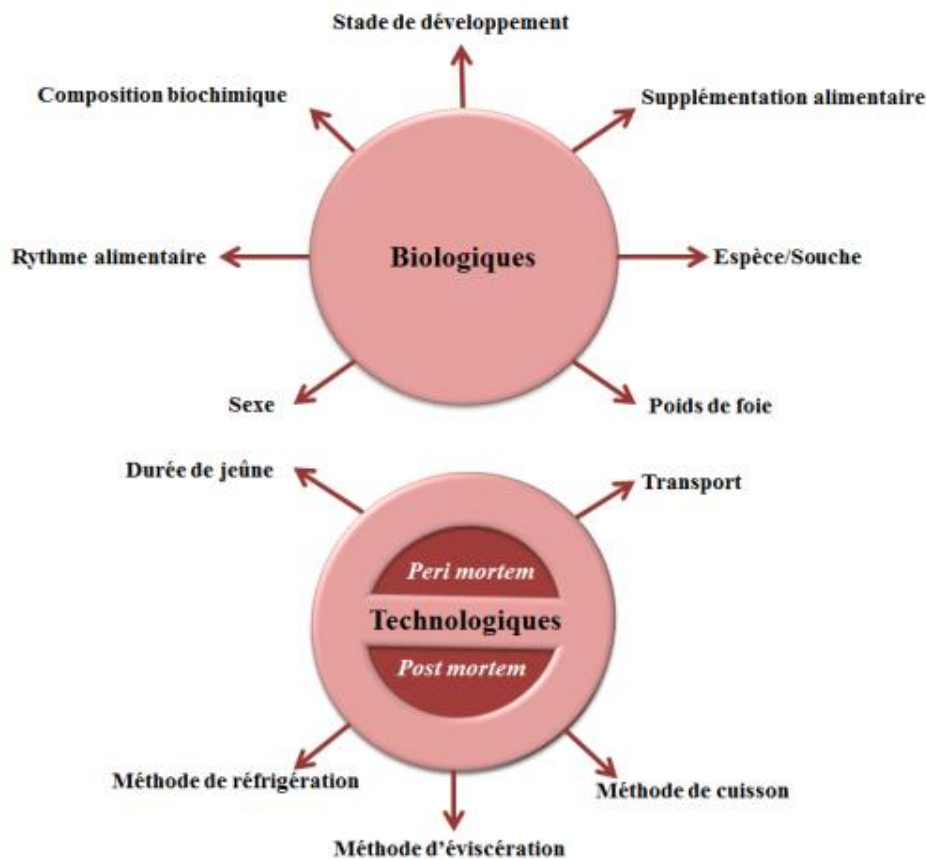


Figure 10 : Facteurs affectant le rendement à la cuisson

3.3.1. Les facteurs biologiques

Le taux de fonte est spécifique à l'espèce et est lié à de nombreux facteurs, tels que le poids de foie, sa composition biochimique et dans certains cas le sexe de l'animal.

L'espèce la plus utilisée pour la production du foie gras est le canard mulard et dans de moindres proportions l'oie landaise (*Anser anser*) et le canard de Barbarie (*Caïrina moschata*).

La fonte est corrélée au poids du foie et au taux d'engraissement. Alors que le poids du foie de l'oie landaise est le plus important (plus de 800 g en moyenne), cette espèce présente un rendement technologique moyen plus élevé que celui des canards. Cette différence de taux de fonte est expliquée par un plus faible taux d'engraissement (54.6 % vs 61.9% et 60.5% chez

l'oie, le canard de Barbarie et le canard mulard respectivement) selon Salichon et al. (1994). Cependant, au sein de la même espèce, les races peuvent différer en ce qui concerne la fonte. Ainsi, il est bien connu que les canards de Barbarie ont un meilleur rendement technologique à la cuisson que les canards Pékins (Blum et al., 1992). Le canard mulard (issu du croisement d'un male Barbarie et d'une femelle Pékin) présente un taux de fonte inférieur à celui de ses deux parents.

La valeur du poids du foie à la fin du cycle de production est inversement proportionnelle au rendement technologique : plus le foie est lourd, plus il va fondre (Bouillier-Oudot et al., 2002). La figure 11 illustre l'effet du poids du foie gras sur son taux de fonte. Le taux d'engraissement à l'abattage est aussi corrélé positivement avec la fonte lipidique à la cuisson (Rousselot-Pailley et al., 1992). Il a donc été montré que plus sa teneur en lipides est élevée, plus le foie est susceptible de fondre. En fait, si le foie contient plus de lipides, le rapport protéines/lipides diminue : ce dernier traduisant la capacité des structures non lipidiques à maintenir les inclusions lipidiques, sa diminution a pour conséquence une augmentation de la fonte lipidique (Blum et al., 1990).

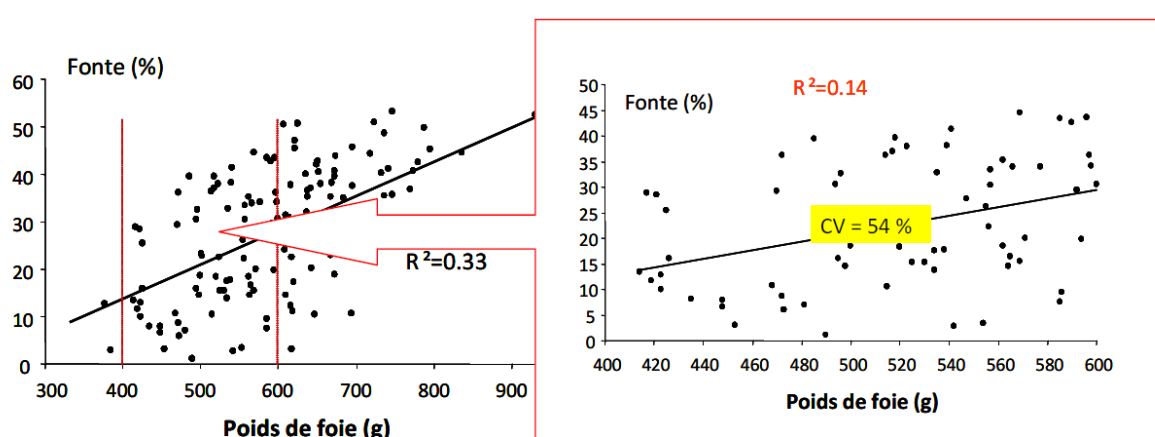


Figure 11 : Expression de la variabilité de la fonte lipidique du foie gras de canard. (CV= Coefficient de Variation) (Théron, 2011)

Présentants une meilleure qualité (couleur, aspect..) et un rendement technologique supérieur par rapport aux foies issus des femelles, seuls les foies de canards mâles sont utilisés pour la production de foie gras. En revanche, les oies mâles et femelles sont gavées en raison de l'absence de différences notables de qualité des foies entre les deux sexes.

D'autres facteurs zootechniques, comme le stade de développement de l'animal à la mise en gavage, la supplémentation alimentaire et le rythme alimentaire en gavage peuvent aussi influencer la qualité technologique du foie gras.

Parce que le régime du gavage est pauvre en protéines, une mise en gavage précoce des animaux est déconseillée car elle peut causer un déficit de croissance chez les palmipèdes en gavage (Auvergne, 1992). En effet, dans ce cas, une concurrence entre la croissance musculaire et les besoins métaboliques et structuraux du foie est induite par l'insuffisance en protéines du régime (Babilé et al., 1993). En conséquence, celui-ci présentera une mauvaise qualité technologique (Baudonnet, 1993). Au contraire, une supplémentation en protéines dans l'aliment de croissance ou dans celui de gavage a des effets positifs sur le développement de la stéatose ainsi que sur la qualité technologique du foie gras. La distribution d'un aliment enrichi en protéines, ou en acides aminés comme la choline, la lysine et la méthionine en cours de gavage améliore le rendement technologique d'environ 10 points (Blum et al., 1971). Ceci serait dû à une meilleure préservation de l'intégrité des membranes plasmiques vis-à-vis des traitements thermiques.

Un rationnement horaire associé à un repas unique, durant deux heures par jour, en période de pré-gavage aide à la préparation des animaux au gavage. Ce rythme alimentaire élevé entraîne la dilatation de l'œsophage et du ventricule succenturié et stimule l'ingestion de quantités importantes d'aliment mais aussi tend à améliorer la qualité technologique du foie gras (Babilé, 1989 ; Baudonnet, 1993). Par contre, un allongement de la durée de gavage tend à détériorer cette qualité technologique en favorisant le dépôt des triglycérides aux dépens des

autres constituants structuraux hépatiques. Cette détérioration de la qualité technologique des foies gras est associée à l'augmentation de l'activité de la lactate déshydrogénase et signale une souffrance hépatique (Latil et al., 1996). Une étude de l'effet de la durée du gavage sur la qualité technologique a montré que les foies de canard mulard ayant reçus 29 gavages avait un taux de fonte d'environ 9% contre 20% pour ceux ayant reçus 35 gavages (Baudonnet, 1993). La réduction de la durée du gavage serait donc favorable à une réduction du taux de fonte à la cuisson.

3.3.2. Les paramètres technologiques

Les paramètres technologiques, que se soient ceux présents dans les heures qui précèdent l'abattage, tels que le transport et la durée de jeûne, ou bien ceux présents justes après la saignée comme les méthodes d'éviscération, de réfrigération et de transformation, affectent eux aussi la qualité technologique du foie gras.

Les études menées sur les effets des facteurs *peri mortem* ont mis en évidence des liens entre le stress, et ses modifications physiologiques induites, et les qualités technologiques et sensorielles du foie gras. Des durées de jeûne de 12 à 24 heures sont réclamées avant l'abattage, chez l'oie et le canard respectivement, pour assurer la vidange du tractus digestif et éviter les risques de contaminations de carcasses au moment de l'éviscération (Rousselot-Pailley et al., 1992). Cependant, quand on approche ou dépasse la durée recommandée, des diminutions du poids vif, du poids du foie et du rendement technologique sont notées (Babilé, 1989). Par exemple, un temps de transport de 150 min a amélioré significativement la qualité technologique du foie gras, indépendamment du poids de foie (22.7 ± 1.9 vs 28.5 ± 1.73 , pourcentage de fonte pour 150 et 30 min de transport respectivement, Fernandez et al., 2011).

L'éviscération à chaud consiste à retirer le foie de la carcasse juste après l'abattage. En revanche, l'éviscération à froid consiste à isoler le foie après le refroidissement de la carcasse entière. Des études ont démontré que la pratique de l'éviscération à froid favorise une augmentation du taux de fonte (Babilé et Auvergne, 1986 ; Rousselot-Pailley et al., 1992). La valeur de la fonte est presque doublée pour les foies éviscérés à froid pour un poids de foie compris entre 600 et 699 g (figure 1). Cette réduction du rendement technologique semble être causée par l'augmentation de catabolisme des glucides et des activités glycolytiques qui réduisent les réserves de glycogène pendant la réfrigération (Bouillier-Oudot et al., 2004).

En étudiant les conséquences des techniques de refroidissement sur la teneur en eau, en matières grasses et sur le taux de fonte de trois catégories de foies (mou, souple et dur), Goullieux et Ingrid (2006) ont remarqué que les foies refroidis sous de la glace sont ceux qui ont le moins fondu (tableau 4). Cette technique semble avoir permis la préservation de l'eau contenue dans le foie, contrairement aux techniques de refroidissement à ventilation positive et négative (Goullieux et Chanut, 2006).

L'étude de l'effet du traitement thermique de stérilisation montre que les valeurs de stérilisation les plus faibles (0.25 vs 0.49 et 0.77) donnent les rendements technologiques les plus élevés (86,1 vs 83,1 et 83,0 %, Leprettre et al., 2002).

Conclusion :

De nombreux paramètres zootechniques et technologiques affectent la fonte lipidique à la cuisson. Cependant, leur maîtrise n'a pas pu éliminer toute la variabilité présente dans le produit final. Entre autres, les techniques d'éviscération et de refroidissement *post mortem* du foie ont un effet important sur le taux de fonte. Ceci pourrait être lié en partie à des mécanismes enzymatiques et en particulier aux activités protéolytiques *post mortem*.

Tableau 4 : Conséquences des techniques de refroidissement sur la teneur en eau, en matières grasses et sur le taux de fonte de trois catégories de foies (mou, souple et dur). (Gouilleux et Ingrid, 2006)

| Paramètre | Traitement | Mou | Souple | Dur | Moyenne |
|--------------------------------|-----------------------|-------|--------|-------|---------|
| Teneur en eau (%) | Glacé | 34,5 | 31,8 | 29,8 | 32,05 |
| | Froid ventilé | 33,5 | 31,1 | 26,9 | 30,3 |
| | Froid ventilé négatif | 29 | 26,6 | 24,6 | 26,7 |
| | Moyenne | 32,3 | 29,8 | 27,1 | 29,7 |
| Teneur en matière grasse libre | Glacé | 55,65 | 56,8 | 56,2 | 56,2 |
| | Froid ventilé | 52,7 | 61,1 | 62,2 | 5,3 |
| | Froid ventilé négatif | 61,9 | 65,3 | 68,05 | 64,6 |
| | Moyenne | 57,2 | 60,8 | 62,5 | 60,2 |
| Fonte % | Glacé | 33,7 | 42,7 | 53,2 | 43,3 |
| | Froid ventilé | 44,3 | 51,9 | 57,6 | 51,8 |
| | Froid ventilé négatif | 57,4 | 63,4 | 65,5 | 62,1 |
| | Moyenne | 45,3 | 52,7 | 58,7 | 52,5 |

4. Les protéases

Les protéases, ou enzymes protéolytiques, sont des enzymes qui catalysent la dégradation des protéines par l'hydrolyse de leurs liaisons peptidiques (figure 12). Ces enzymes sont présentes chez toutes les plantes, les animaux et les microorganismes et représentent environ 2% de leur génome. Les protéases sont connues pour être des enzymes impliquées dans la dégradation des aliments et libérant des plus petits peptides et des acides aminés essentiels pour l'organisme. Ceci est bien la caractéristique la plus essentielle de protéases telles que la trypsine, la chymotrypsine et la pepsine (Rani et al., 2012). Elles sont aussi connues pour leur implication dans le renouvellement des protéines cellulaires. De plus, les protéases cellulaires sont aussi capables d'apporter des modifications sélectives aux protéines par un clivage limité tels que l'activation des zymogènes, la coagulation sanguine, le transport et la sécrétion des protéines... Ces enzymes semblent aussi être impliquées dans beaucoup d'autres processus physiologiques complexes tels que la progression du cycle cellulaire, la prolifération des cellules et la mort cellulaire, la réplication de l'ADN, le remodelage des tissus, l'homéostasie, la cicatrisation des plaies et la réponse immunitaire. Ces propriétés rajoutent un intérêt considérable à ce groupe d'enzymes (Mohamed et Sloane, 2006 ; Turk, 2006 ; Turk et Stoka, 2007).

www.brenda-enzymes.org/index.php4

BRENDA home
login
history
All enzymes

BRENDA
The Comprehensive Enzyme Information System

EC Explorer [SEARCH] [BROWSE]

1 Oxidoreductases (6951 organisms)
2 Transferases (5035 organisms)
3 Hydrolases (8314 organisms)
3.1 Acting on ester bonds (3011 organisms)
3.2 Glycosylases (3300 organisms)
3.3 Acting on ether bonds (127 organisms)
3.4 Acting on peptide bonds (peptidases) (1754 organisms) ← Les Protéases
3.4.1 α-Amino-acyl-peptide hydrolases (deleted sub-subclass) (576 organisms)
3.4.2 Peptidyl-amino-acid hydrolases (deleted sub-subclass) (1398 organisms)
3.4.3 Dipeptide hydrolases (deleted sub-subclass)
3.4.4 Peptidyl peptide hydrolases (deleted sub-subclass)
3.4.11 Aminopeptidases (292 organisms)
3.4.12 Peptidylamino-acid hydrolases or acylamino-acid hydrolases (deleted sub-subclass)
3.4.13 Dipeptidases (84 organisms)
3.4.14 Dipeptidyl-peptidases and tripeptidyl-peptidases (97 organisms)
3.4.15 Peptidyl-dipeptidases (76 organisms)
3.4.16 Serine-type carboxypeptidases (65 organisms)
3.4.17 Metallo-carboxypeptidases (107 organisms)
3.4.18 Cysteine-type carboxypeptidases (6 organisms)
3.4.19 Omega peptidases (80 organisms)
3.4.21 Serine endopeptidases (693 organisms)
3.4.22 Cysteine endopeptidases (366 organisms)
3.4.23 Aspartic endopeptidases (256 organisms)
3.4.24 Metalloendopeptidases (392 organisms)
3.4.25 Threonine endopeptidases (55 organisms)
3.4.99 Endopeptidases of unknown catalytic mechanism (sub-subclass is currently empty)
3.5 Acting on carbon-nitrogen bonds, other than peptide bonds (1822 organisms)
3.6 Acting on acid anhydrides (927 organisms)
3.7 Acting on carbon-carbon bonds (117 organisms)
3.8 Acting on halide bonds (119 organisms)
3.9 Acting on phosphorus-nitrogen bonds (3 organisms)
3.10 Acting on sulfur-nitrogen bonds (7 organisms)
3.11 Acting on carbon-phosphorus bonds (42 organisms)
3.12 Acting on sulfur-sulfur bonds (19 organisms)
3.13 Acting on carbon-sulfur bonds (16 organisms)
4 Lyases (3622 organisms)
5 Isomerases (1373 organisms)
6 Ligases (1149 organisms)

Quick Search
Fulltext Search
Advanced Search
Substructure Search
TaxTree Explorer
EC Explorer
Sequence Search
Genome Explorer
Ontology Explorer
Functional Enzyme Parameters
SBML Output
SOAP Soap

Tutorial/Training
BRENDA Input
Propose new enzyme
Improve BRENDA!
Introduction/References
Contact and Impressum
News
Jobs
Copyright
Related Links
Help
Acknowledgements
BRENDA on Facebook
BRENDA Professional
Commercial Version
Release 2013.2 (July 2013)

Figure 12 : Les Protéases sont classées au sous-groupe 4 du 3^{ème} groupe (hydrolases).
http://www.brenda-enzymes.org/index.php4

4.1. Classement des protéases hépatiques

Selon leur mécanisme d'action, les protéases peuvent être dites à cystéine, à thréonine ou à sérine, être des métalloprotéases, ou des protéases aspartiques ou glutamiques. Il existe aussi d'autres protéases diverses qui ne correspondent pas à la classification standard ex. la protéase ATP-dépendante qui requiert de l'ATP pour être activée (Raghunath et Badgujar, 2010). Les protéases glutamiques sont les seules protéases qui ne sont pas présentes chez les mammifères. Les protéases clivent spécifiquement leurs substrats protéiques soit au niveau du C ou du N terminal, soit au milieu de la molécule. Selon leur site d'action on peut subdiviser les protéases en deux grands groupes i.e. les exo- et les endoprotéases.

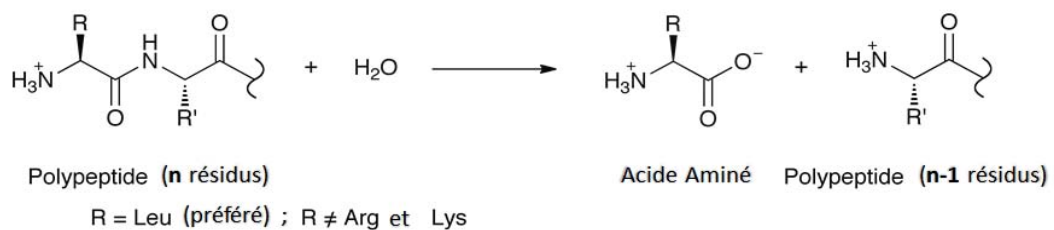
4.1.1 Les exoprotéases

Les exoprotéases ou peptidases sont des enzymes qui possèdent une activité exoprotéasique, permettant donc l'hydrolyse des acides aminés à partir de leurs extrémités N- ou C- terminale (figure 13).

- **Les Aminopeptidases** agissent sur une extrémité N-terminale libre de la chaîne polypeptidique et libèrent soit un acide aminé, soit un dipeptide ou un tripeptide. En général les aminopeptidases sont des enzymes intracellulaires présentes dans de nombreux organelles ainsi que dans le cytoplasme et les composants membranaires (Rani et al., 2012b). Leur pH optimal d'activité varie entre 7.5 et 10.5 et la plupart requièrent un ion Zn^{2+} pour une activité optimale. Certaines sont monomériques et d'autres sont des polymères de poids moléculaire relativement élevé (50 kDa). Les aminopeptidases sont essentielles pour la maturation des protéines, la dégradation des peptides et la détermination de la stabilité des protéines (Taylor, 1993).

Les Carboxypeptidases clivent les liaisons peptidiques au niveau du groupement carboxyle libre (Breddam, 1986). Selon la nature de l'acide aminé résiduel de leur site actif, les carboxypeptidases sont divisées en trois principaux groupes i.e. les carboxypeptidases à sérine, les métallocarboxypeptidases et les carboxypeptidases à cystéine. Bien que les premières carboxypeptidases découvertes aient été celles impliquées dans la digestion des aliments, la plupart des carboxylases ne sont pas impliquées dans le catabolisme cellulaire. Ces protéases sont plus connues pour aider à la maturation des protéines, à la régulation de processus biologiques tels que la biosynthèse des peptides neuroendocrines (ex. l'insuline), la coagulation sanguine, la production de facteurs de croissance, la cicatrisation des plaies, la reproduction cellulaire... Certaines carboxypeptidases sont produites sous une forme inactive (zymogène) comme par exemple la carboxypeptidase A (Folk et Schirmer, 1963).

Leucine Aminopeptidase



Carboxypeptidase B

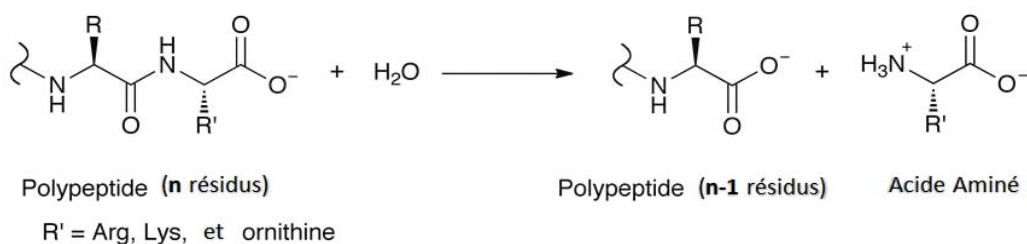


Figure 13 : Exemples de différentes réactions enzymatiques : Aminopeptidase vs Carboxypeptidase (<http://www.worthington-biochem.com/lapc/images/reaction.jpg> et <http://www.worthington-biochem.com/COB/images/reaction.jpg>)

4.1.2

Les endopeptidases

Les endoprotéases ou protéinases sont des enzymes qui hydrolysent la liaison peptidique au niveau de sites spécifiques internes.

Les protéases à sérine

Les protéases à sérine se caractérisent par la présence d'un groupe sérine dans leur site actif. Toutes les protéases à sérine contiennent trois résidus au niveau de leur site actif : une sérine, une histidine et un aspartate. Les protéases à sérine sont nombreuses et répandues chez les virus, les bactéries ainsi que chez les eucaryotes, ce qui suggère qu'elles sont vitales pour les organismes. Elles sont généralement actives à un pH neutre à alcalin situé entre 7 et 11 (Hedstrom, 2002). Les protéases à sérine sont responsables de nombreuses fonctions physiologique comme la digestion, la réponse immunitaire, la coagulation du sang et la reproduction (Hedstrom, 2002).

Les protéases aspartiques

Les protéases aspartiques sont des endopeptidases qui possèdent un ou deux résidus d'acide aspartique au niveau de leur actif. Les protéases aspartiques sont des protéases acides dont le pH optimal est situé entre 2 et 5 (Voynick et Fruton, 1971). Ces protéases jouent un rôle essentiel dans la régulation de la pression sanguine (rénine) et la digestion (pepsine et chymosine).

Les protéases à cystéines

Les protéases à cystéine sont présentes chez les procaryotes ainsi que chez les eucaryotes. A ce jour, 20 familles de protéases à cystéine ont été découvertes. L'activité de toutes les protéases à cystéine dépend d'une dyade composée d'une cystéine et d'une histidine. Ces protéases sont généralement actives à un pH neutre, avec quelques exceptions telles que les protéases lysosomales qui sont actives à un pH acide (Chapman et al., 1994). Les protéases à cystéines sont impliquées dans le processus de l'apoptose et jouent un rôle important dans l'attendrissage de la viande.

Les métalloprotéases

Ces protéases sont les plus diverses au regard de leurs types catalytiques. Elles se caractérisent par le besoin de la présence d'un ion métallique bivalent pour accomplir leur activité. En se basant sur la spécificité de leur site actif les métalloprotéases sont divisées en 4 groupes: les neutres, les alcalines, les myxobactères I et myxobactères II (Rao et al., 1998).

4.2 Les principales protéases

4.2.1 Les MMPs

Les métalloprotéinases ou MMPs constituent une famille d'enzymes qui hydrolysent la matrice extracellulaire (ECM). Les membres de cette famille qui présentent des similarités de structure et de fonction, nécessitent du calcium pour leur activation. Les MMPs sont caractérisées par la présence d'un ion Zn^{2+} lié à 3 résidus histidine au niveau de leur site catalytique. Les MMPs sont synthétisées et secrétées sous la forme de proenzymes inactives.

L'activité des MMPs est régulée par plusieurs types d'inhibiteurs, parmi lesquels les TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinase) sont les plus importants. La balance entre les MMPs et les TIMPs est responsable du contrôle de la dégradation des protéines de la MEC. Ces protéinases jouent un rôle central dans de nombreux processus biologiques comme l'embryogenèse, le remodelage des tissus, la cicatrisation des plaies, le développement des dents (Pilcher et al., 1999 ; Steffensen et al., 2001). Cependant, un déséquilibre de cette balance est aussi caractéristique de diverses pathologies telles que la rhumatoïdite et l'ostéoarthrite, le cancer et les maladies cardiovasculaires (Konttinen et al., 1999 ; Tetlow et al., 2001 ; Baker et al., 2002). Les MMPs sont généralement constituées d'un peptide signal, d'un domaine propeptidique, d'un domaine catalytique et d'un domaine C terminal hemopexin-like, qui sont présents chez toutes les MMPs (Nagase et Woessner, 1999). Le domaine catalytique, le site de liaison du zinc, est constitué d'environ 170 résidus d'acides aminés et contient un motif conservé (HEXXHXXGXXH). Le propeptide, constitué d'environ 80 acides aminés, contient le motif PRCGXPD dans lequel le résidu cystéine interagit avec le domaine actif (Wart et Birkedal-Hansen, 1990). Trois caractéristiques sont communes à toutes les MMPs i.e. l'homologie de séquence avec la MMP-1, le site de liaison du zinc et le résidu cystéine (à l'exception de la MMP-23 à qui manque le résidu cystéine, figure14).

Plusieurs MMPs ont des domaines additionnels comme le domaine transmembranaire ou cytoplasmique (Nagase et Woessner, 1999 ; Stamenkovic, 2003). La famille des MMPs contient plus de 24 formes différentes, dont 23 ont été identifiées chez l'homme. Selon le type de substrat, la similarité de séquence et l'organisation des domaines, les MMPs chez les vertébrés peuvent être sous classées en six groupes: collagénases, gélatinases, stromélysines, matrilysines, MMPs Type Membrane et autres types de substrats (Pendás et al., 1997 ; Bar-Or et al., 2003) (Tableau 5).

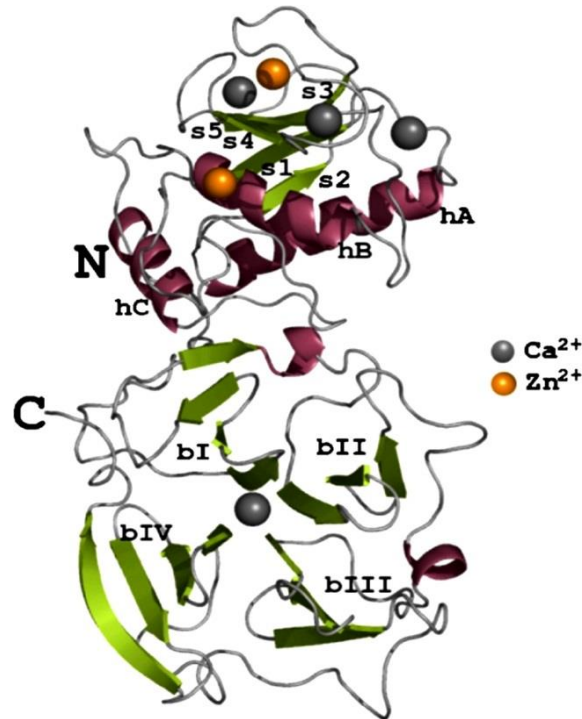


Figure 14: Schéma de la structure cristallographique en ruban de la MMP-1. En rose les hélices (ha, hb et hc). En vert les brins (strands S1 à 5) et coudes (blades bI à IV). Il existe quatre ions calcium et deux ions zinc présents dans la structure colorés en gris et en orange respectivement (Iyer et al., 2006)

Le groupe des collagénases comprend les MMP-1, MMP-8, MMP-13 et MMP-18. Ces protéases sont généralement capables de cliver les collagènes I, II et III et V. La MMP-13 est capable de dégrader une grande variété d'autres substrats de la MEC.

La MMP-2 (gélatinase A) et la MMP-9 (gélatinase B) sont des gélatinases qui dégradent essentiellement la gélatine c'est à dire la forme dénaturée du collagène. La MMP-2, contrairement à la MMP-9, est aussi capable de digérer les collagène de type I, II et III.

Les stromélysines, MMP-3 et 10, digèrent les protéines de la MEC telles que le collagène IV et la fibronectine. La MMP-3 (stromélysine 1) est essentielle pour l'activation de nombreux pro-MMPs, cependant la MMP-10 (stromélysine 2) a une efficacité protéolytique plus importante que la MMP-3. La stromélysine 3 ou MMP-11 est souvent classée avec les "autres MMPs" à cause de sa séquence et de sa spécificité de substrat qui divergent de celles de la MMP-3.

Tableau 5 : Classification des MMPs selon leur spécificité de substrat, leur similarité de séquence et l'organisation de leurs domaines (Visse et Nagase, 2003)

| Collagénases | |
|---------------------------|---------------------|
| MMP-1 | Collagénase 1 |
| MMP-8 | Collagénase 2 |
| MMP-13 | Collagénase 3 |
| MMP-18 | Collagénase 4 |
| Gélatinases | |
| MMP-2 | Gélatinase A |
| MMP-9 | Gélatinase B |
| Stromélysines | |
| MMP-3 | Stromélysine 1 |
| MMP-10 | Stromélysine 2 |
| MMP-11 | Stromélysine 3 |
| Matrilysines | |
| MMP-7 | Matrilysines 1 |
| MMP-26 | Matrilysines 2 |
| MMPs Type-Membrane | |
| Transmembrane | |
| MMP-14 | MT1-MMP |
| MMP-15 | MT2-MMP |
| MMP-16 | MT3-MMP |
| MMP-24 | MT5-MMP |
| GPI anchor | |
| MMP-17 | MT4-MMP |
| MMP-25 | MT6-MMP |
| Autres | |
| MMP-12 | Macrophage elastase |
| MMP-19 | RASI-1 |
| MMP-20 | Enamelysine |
| MMP-21 | XMMP |
| MMP-23 | CA-MMP |
| MMP-27 | CMMP |
| MMP-28 | Epilylsine |

Les matrilysines se caractérisent par l'absence du domaine hemopexine. La MMP-7 (matrilysine 1) et MMP-26 (matrilysine 2) qui dégradent les protéines de la MEC appartiennent à ce groupe. De plus, la MMP-7 dégrade des molécules de la surface cellulaire.

Six MMP appartiennent au groupe des MMPs de type membranaire (MT-MMPs). Les MMP-14, -15, -16 et 24 forment le sous-groupe de protéines transmembranaires de type I. La MMP-17 avec la MMP-25 forment le groupe des «glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored proteins». A l'exception de la MMP-17, tous les membres de ce groupe sont capables d'activer la MMP-2. Ces enzymes sont aussi capables de digérer le contenu de la MEC et la MMP-14 a été identifiée comme ayant une activité collagénolytique sur les collagènes de type I, II, et III. La MMP-24 est spécifique du cerveau et la MMP-25 est principalement exprimée dans la cervelle.

Sept MMPs ne sont pas classées dans une des catégories citée précédemment, elles sont donc répertoriées comme «autres MMPs». La MMP-12 est principalement exprimée dans les macrophages. Elle digère l'élastine et d'autres protéines. La MMP-19 a été identifiée à partir d'un clonage d'ADNc de foie (Powell et al., 1999). La MMP-20, qui digère l'amélogénine est principalement localisée dans l'email nouvellement formé. La MMP-22 a été identifiée pour la première fois dans des fibroblastes de poulet mais la fonction de cette enzyme n'est pas encore connue. La MMP-23 est exprimée dans le système reproducteur (Nakamura et al., 1998). La MMP-28 est principalement exprimée dans les kératinocytes et joue un rôle essentiel dans l'hémostasie des tissus et la cicatrisation des plaies (Shimada et al., 1999 ; Belkin et al., 2001).

4.2.2 Les Cathepsines

Les cathepsines constituent une famille d'enzymes dont la majorité sont des protéases stockées dans les lysosomes et actives à pH acide. Les lysosomes, aussi connus sous le nom de «sacs suicides», sont de petits organites sphériques présents dans la plupart des cellules animales (Goll et al., 1983). Les cathepsines lysosomales sont présentes dans tous les types cellulaires à l'exception des globules rouges. Elles sont également localisées dans d'autres compartiments cellulaires comme le noyau, le cytoplasme et la membrane plasmique. A l'exception des cathepsines A, B, C et H, les cathepsines sont des endoprotéases qui sont synthétisées sous la forme de pro-enzymes latentes. Les cathepsines acquièrent leur capacité protéolytique au cours de mécanismes de glycosylation, de phosphorylation... Les cathepsines sont souvent des protéines monomériques dont la masse moléculaire varie entre 20 et 50 kDa. En fonction de la nature des acides aminés du site actif impliqué dans la catalyse enzymatique, les cathepsines peuvent être des protéases à aspartate, à sérine ou à cystéine (tableau 6). Il existe deux cathepsines aspartiques, la cathepsine D et la E. La cathepsine D est la plus abondante des enzymes lysosomales. Son poids moléculaire est de 42 kDa et elle a un pH optimal d'activité compris entre 3 et 5. Elle dégrade des protéines comme l'hémoglobine, la myosine et les protéines sarcoplasmiques. Contrairement aux autres cathepsines, la cathepsine E est principalement localisée dans l'endosome. La cathepsine E est connue pour être impliquée dans de nombreuses réponses immunitaires (Takehashi et al., 2007).

Les cathepsines A, G et R sont des protéases à sérine. La cathepsine A est à la fois une endopeptidase et une exopeptidase qui en s'associant à d'autres enzymes lysosomales forment un complexe qui assure leur stabilité et leur protection (Van der Spoel et al., 1998). Les cathepsines G et R sont des endopeptidases localisées au niveau de la membrane cellulaire et du cytosquelette respectivement.

Tableau 6 : Propriétés des différentes cathepsines des mammifères (adapté de Blanchet, 2010)

| type catalytique | Nom | Endopeptidase | Exopeptidase | | localisation | pH |
|----------------------|--------------------|---------------|------------------|----------------|----------------------|-----------|
| | | | carboxypeptidase | Aminopeptidase | | |
| Protéase à sérine | cathepsine A | + | + | - | lysosome | 4 à 7,5 |
| | cathepsine G | + | - | - | membrane cellulaire | 5 à 8,4 |
| | cathepsine R | + | - | - | lysosome, cytoplasme | 4,8 à 7 |
| Protéase à aspartate | cathepsine D | + | - | - | lysosome | 4 à 6 |
| | cathepsine E | + | - | - | lysosome, endosome | 4 à 7,4 |
| Protéase à cystéine | cathepsine B | + | + | + | lysosome, mélanosome | 4 à 6 |
| | cathepsine C | - | - | + | lysosome | 4,5 à 6,8 |
| | cathepsine F | + | - | - | lysosome | 5,2 à 6,8 |
| | cathepsine H | + | - | + | lysosome | 4 à 8 |
| | cathepsine I | + | N.D. | N.D. | lysosome | N.D. |
| | cathepsine K | + | - | - | lysosome, endosome | 4 à 8 |
| | cathepsine L | + | - | - | lysosome | 4 à 7 |
| | cathepsine M | + | N.D. | N.D. | lysosome | N.D. |
| | cathepsine N | + | - | - | lysosome | N.D. |
| | cathepsine O | + | N.D. | N.D. | cytoplasme | N.D. |
| | cathepsine P (J) | + | N.D. | N.D. | lysosome | N.D. |
| | cathepsine Q | + | N.D. | N.D. | lysosome | N.D. |
| | cathepsine R | + | N.D. | N.D. | lysosome, cytoplasme | 4,8 à 7 |
| | cathepsine S | + | - | - | lysosome | 4,5 à 8 |
| | cathepsine T | + | - | - | lysosome | 6,5 à 7,5 |
| | cathepsine V | + | - | - | lysosome | 4 à 7,2 |
| | cathepsine W | N.D. | N.D. | N.D. | lysosome, cytoplasme | N.D. |
| | cathepsine X (Y,Z) | - | + | - | lysosome | N.D. |

Les cathepsines à cystéine appartiennent au clan CA des protéases à cysteine et spécifiquement à la famille C1 des enzymes «papaïn-like» grâce à leur ressemblance avec la papaïne. Les protéines matures sont généralement monomériques à l'exception de la cathepsine C qui est tétramérique. Il existe environ 18 cathepsines à cystéine dont 11 ont été identifiées chez l'homme i.e. cathepsines B, C, F, H, K, L, O, S, V, W, X. Les cathepsines Q et T ont été identifiées chez le rat (Gohda et Pitot, 1981 ; Nikawa et al., 1992 ; Sakamoto et al., 1999 ; Sol-Church et al., 2000a), les cathepsines M et P chez la souris (Sol-Church et al., 2000b ; Hassanein et al., 2009), la cathepsine I chez le lapin (Chatterjee et Kalnitsky, 1986) et la cathepsine N chez les bovins (Ducastaing, 1978).

La majorité des cathepsines sont ubiquitaires ce qui indique qu'elles sont essentiellement impliquées dans la dégradation des protéines et donc le remodelage cellulaire, mais elles peuvent également avoir des fonctions physiologiques spécifiques selon leurs différentes localisations. Par exemple la cathepsine K est fortement exprimée dans les ostéoclastes et la plupart des cellules épithéliales. Parmi les enzymes dégradant la matrice cellulaire, la cathepsine K est la seule à avoir un rôle essentiel dans la résorption des os (Asagiri et Takayanagi, 2007). Des études récentes ont montré l'implication des cathepsines dans le contrôle des mécanismes de nombreux processus normaux et pathologiques. La cathepsine S est principalement exprimée dans les APCs (antigen-presenting cells) telles que les cellules dendritiques et les cellules-B (Hsing et Rudensky, 2005). Au contraire, la cathepsine L est une protéase ubiquitairement exprimée alors que la cathepsine V est strictement exprimée dans le thymus et les testicules et ce malgré la forte homologie entre ces deux cathepsines. Les fonctions spécifiques des cathepsines dépendent aussi en partie de leur localisation à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules (Turk, 2006 ; Turk et Stoka, 2007).

De nombreuses études ont montré que les cathepsines jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus physiologiques, tels que le traitement des antigènes, le remodelage osseux, le traitement des prohormones et la cicatrisation des plaies. Leur implication dans plusieurs pathologies, notamment l'ostéoporose, l'arthrite rhumatoïde, l'arthrose, l'asthme bronchique et le cancer a été confirmée et plusieurs d'entre elles ont été validées comme des cibles pertinentes pour les thérapies (McKerrow, 1999).

4.2.3 Les calpaïnes

Les calpaïnes sont des protéases à cystéine de par la présence d'un acide aminé cystéine dans leur site actif. Ce sont des protéases non-lysosomiales, dont l'activité, de type papaïne, est dépendante du calcium (CAPN: Calcium Activated Neutral Proteases). Les calpaïnes sont présentes chez tous les vertébrés et sont répandues chez une grande variété d'organismes. A ce jour, 14 calpaïnes ont été identifiées dans différents types cellulaires. Certaines calpaïnes sont majoritairement exprimées dans un nombre limité d'organes, elles sont donc tissu spécifique. Par exemple la calpaïne 3 est spécifique aux muscles squelettiques, la calpaïne 8 est estomac-spécifique, la calpaïne 14 est spécifique aux testicules et aux poumons (Sorimachi et al., 1995 ; Sorimachi et Suzuki, 2001). Mais des calpaïnes sont ubiquitaires comme la μ -calpaïne et la m-calpaïne qui sont les plus étudiées. Comme leurs noms l'indiquent, la μ et m-calpaïne sont activées *in vitro* par des concentrations micro- et millimolaires de Ca^{2+} respectivement (Lee et al., 2007).

Les calpaïnes sont des hétérodimères constituées d'une petite et d'une grosse sous-unité. La petite sous-unité régulatrice est commune à toutes les calpaïnes et est d'environ 30 kDa. La sous unité régulatrice est constituée de 2 domaines (V et VI) dont les rôles ne sont pas encore

clairement définis. La grosse sous-unité catalytique de 80 kDa porte le site actif et possède une activité protéolytique. Elle est spécifique à la calpaïne considérée et peut être sous-divisée en 4 domaines fonctionnels (I, II, III et IV). Chacun des 6 domaines constituant les calpaïnes a donc un rôle précis. Les domaines I et V, situés du côté N-terminal de la sous-unité catalytique et de la sous-unité régulatrice respectivement, jouent un rôle dans l'autolyse de l'enzyme. Le domaine II, catalytique, contient une cystéine, une histidine et une asparagine qui sont impliquées dans la réaction enzymatique. En l'absence de calcium, le résidu cystéine est trop éloigné pour interagir avec les deux autres résidus. Par contre, la fixation d'un ion calcium permet la formation d'une triade correspondant au site actif de l'enzyme (figure 15). Ce domaine montre une similarité avec d'autres protéinases à cystéine telles que les cathepsines B, L et H. Le domaine III assure la liaison entre le domaine catalytique II et le domaine de fixation du calcium ou domaine IV. Ce domaine est aussi le lieu de fixation de la calpastatine (inhibiteur endogène des calpaïnes). Les domaines IV et VI sont très similaires, ils présentent 5 motifs «EF-hand», qui sont des structures de fixation des ions calcium (Goll et al., 2003).

L'activation des calpaïnes se fait en 4 étapes: la dissociation des deux sous-unités, l'autolyse, l'activité protéolytique et la régulation par la calpastatine. L'activation des calpaïnes commence par la dissociation de deux sous-unités et est due à la fixation du calcium aux sites spécifiques, tels que les motifs «EF-hands». L'autolyse est caractérisée par la modification de la partie N-terminale des deux sous-unités.

Les calpaïnes sont responsables de la protéolyse de nombreux substrats. Leur activité est impliquée dans de nombreux processus physiologiques fondamentaux comme le remodelage cyto-squelettique, la signalisation cellulaire, la régulation de l'expression des gènes et la dégradation du substrat dans certaines voies apoptotiques. Le fait que les calpaïnes clivent les polypeptides sur un nombre limité de sites, génère de gros fragments qui restent souvent

actifs : ceci suggère que des calpaïnes ont plus des fonctions régulatrices et de signalisation qu'une réelle fonction de digestion

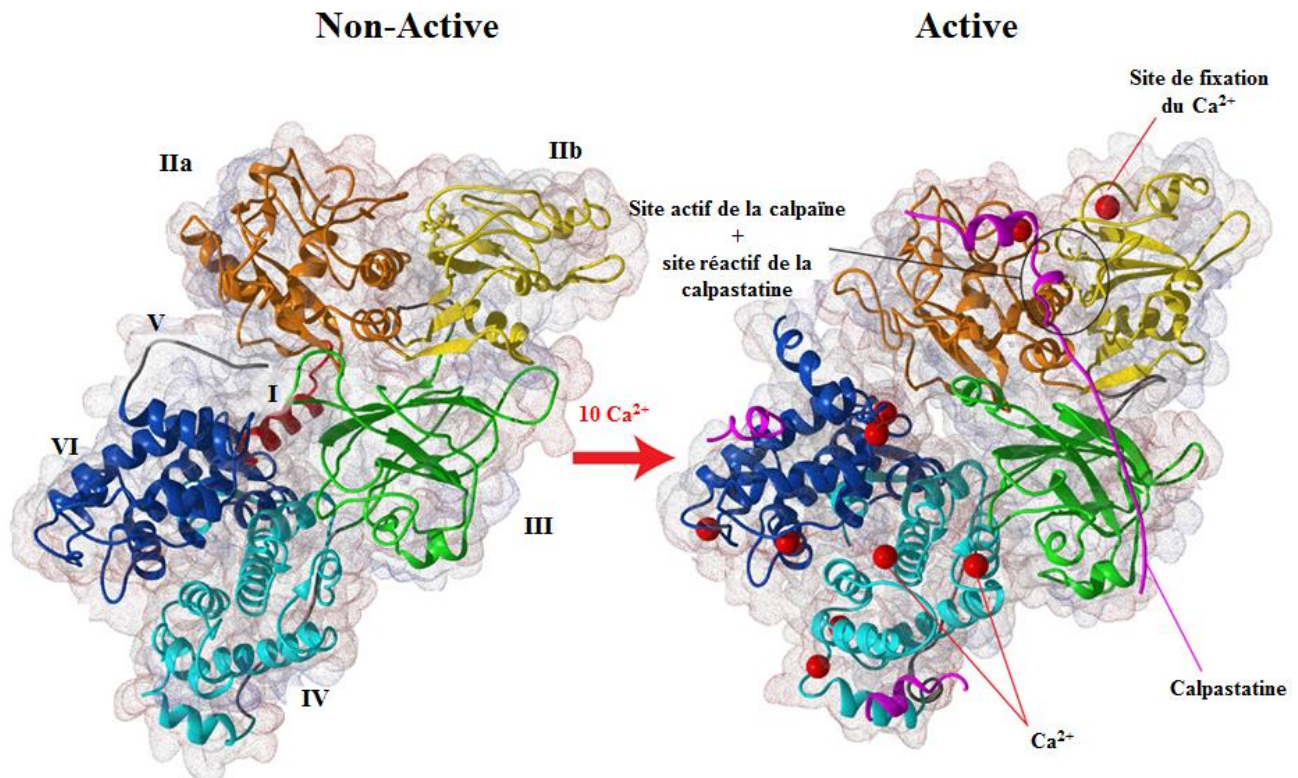


Figure 15 : Schéma de la structure cristallographique en ruban de la m-calpaïne humaine en l'absence et en présence du calcium (Adaptée de <http://calpain.net/3dstructure/index.html>)

La μ et m- calpaïne ont la même spécificité de substrat et les mêmes fonctions physiologiques. Le fait qu'elles soient présentes en ratios variables selon le type cellulaire considéré suggère également qu'elles répondent à différents signaux cellulaires.

L'expression des calpaïnes est modifiée dans des tumeurs et dans d'autres états pathologiques tels que la maladie d'Alzheimer, les diabètes ou les dystrophies musculaires.

Les calpaïnes sont donc impliquées dans de nombreux états pathologiques. La dystrophie musculaire des ceintures (Type 2A) résulte des disruptions du gène CAPN3 codant pour la calpaïne 3 (Richard et al., 1995). La sous expression de la calpaïne 9 est associée au cancer de l'estomac chez l'homme (Yoshikawa et al., 2000). La mutation du gène codant pour la CAPN

10 augmente le risque de diabète de type 2. D'autres maladies telles que la maladie d'Alzheimer ou la formation de cataracte, sont liées à des activités anormales des calpaïnes causées par une perturbation des voies liées à l'homéostasie du Ca^{2+} (Grynspan et al., 1997 ; Tidball et Spencer, 2000).

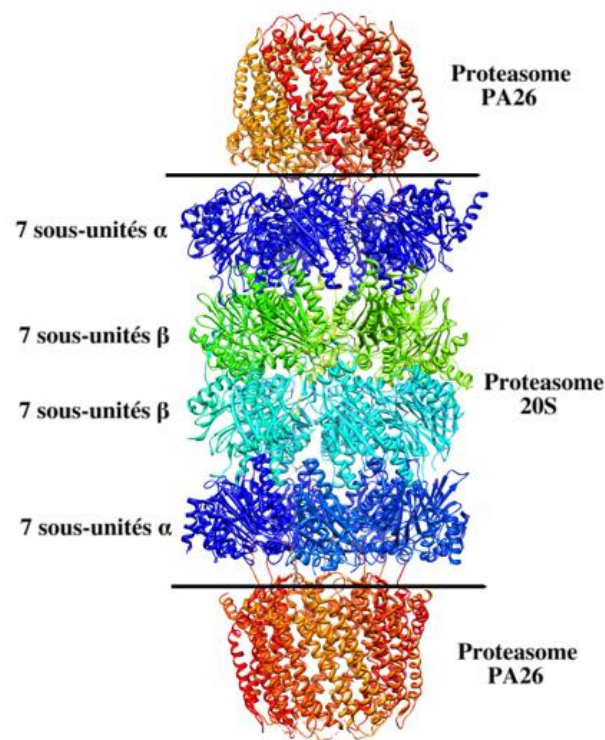
4.2.4 Le Protéasome

Le protéasome est un complexe enzymatique multiprotéique ubiquiste, de grande taille, responsable de la dégradation des protéines intracellulaires. Le protéasome est présent chez les procaryotes, les eucaryotes, les archées ainsi que chez quelques bactéries. Le protéasome joue un rôle majeur dans la plupart des processus biologiques, notamment au travers de la dégradation régulée de protéines régulatrices de ces processus. L'hydrolyse des protéines par le protéasome se fait en deux étapes. La première étape se caractérise par un marquage covalent (ubiquitynation) des protéines à dégrader par leur conjugaison à une chaîne de poly-ubiquitine (polyUb). La deuxième étape consiste en la dégradation du substrat ubiquitynilé par une protéase géante appelée le protéasome 26S (figure 16).

Le protéasome 26S, la forme la plus répandue, a un poids moléculaire d'environ 2,5 MDa, ainsi que les autres composants du protéasome, est nommé d'après son coefficient de sédimentation de Svedberg (S, Demartino et Gillette, 2007). Il est constitué d'un cœur catalytique appelé 20 S et de deux complexes régulateurs 19 S placés de chaque côté du 20S. Ce dernier est un cylindre creux de 1,2 à 1,5 nm de diamètre intérieur et 11 nm de diamètre extérieur et de 11 nm de longueur. Il est formé de 4 anneaux dont 2 sont internes β et 2 externes α . Sept sous-unités constituent chacun des anneaux (d'une taille de 20 à 37 kDa). Le cœur catalytique a une masse moléculaire d'environ 750 KDa et possède 6 sites protéolytiques

ayant différentes activités protéolytiques. Les deux protéasome 19S, chacun d'environ 700 kDa, ont pour rôle de reconnaître et de déstructurer les protéines cibles.

**Figure 16 : structure du protéasome 26S (<http://biochimej.uni->
Complexe proteasome 20S - PA26 (PDB : 1fnt)**



E. Jaspard (2011) / Chimera

vangers.fr/Page2/COURS/Zsuite/3BiochMetab/7Ubiquitinylation/3Figures/6StructProteasome/0ProteasomeCHIMERA/1Proteasome.png

Le protéasome 19S, qui possède une vingtaine de sous-unités à activité ATPasique ou non-ATPasique, est divisé en deux parties i.e. le chapeau et la base. Le chapeau élimine les groupements d'ubiquitine présents sur la protéine cible qui sera ensuite captée et dénaturée par la base. Une fois dénaturée, la protéine passe par la base à l'intérieure du cylindre 20S pour être dégradée (Tanaka, 2009).

Dans les cellules eucaryotiques, la dégradation de la plupart des protéines intracellulaires est réalisée par le protéasome. Les protéines à dégrader sont marquées par l'ubiquitine. Cette dernière est une protéine de 76 acides aminés, qui se fixe sur la protéine cible et sert de signal

de reconnaissance pour la dégradation par le protéasome 26S. En entrant dans le canal du protéasome, la chaîne polypeptidique de la protéine se déplie et s'étend pour être hydrolysée en petits peptides. Pratiquement tous les processus intracellulaires, y compris le contrôle du cycle cellulaire, la transcription, la régulation de la traduction, la réponse cellulaire au stress, etc. sont contrôlés par le système ubiquitine-protéasome (Sorokin et al., 2009).

4.2.5 Les caspases

Les «cysteine-dependant aspartyl-specific proteases» ou caspases forment une famille de protéases à cystéine qui clivent leur substrat après un résidu aspartate contenu dans un motif tétrapeptidique spécifique à chaque caspase. Les caspases sont synthétisées sous des formes inactives (procaspases) dont le poids moléculaire varie entre 30 et 50 kDa. Les procaspases sont ensuite clivées et dimérisées pour former des caspases actives. Le domaine de mort «death domaine» responsable de la transduction du signal apoptotique est situé à l'extrémité N-terminal. Le domaine de mort, dont la taille varie entre 3 et 24 kDa, contient deux sous domaines, un domaine effecteur de mort (DED) et un domaine de recrutement de la caspase (CARD). Le centre de la procaspase ou p20 correspond à la grande sous unité catalytique. En position C-terminale se situe la petite région catalytique ou p10.

Quatorze caspases ont été identifiées dont 11 sont présentes chez l'homme (caspases 1 à 10 et la caspase 14). Chez les oiseaux seules les caspases 5 et 13 ne sont pas présentes. Selon leurs fonctions et la taille de leur prodomaine, les caspases peuvent être divisées en 3 groupes: Classe I, II et III (figure 17).

Les caspases de classe I possèdent un long prodomaine et sont au nombre de 6. Ces caspases sont impliquées dans l'inflammation et comprennent les caspases 1, 4, 5, 11, 12 et 13. Ces caspases possèdent un prodomaine CARD, à l'exception de la caspase 11. Les caspases de classe II comprennent les caspases 2, 8, 9 et 10. Ce sont les caspases initiatrices de l'apoptose et elles possèdent un long domaine N-terminal. Le prodomaine des caspases 2 et 9 présente un domaine CARD contrairement aux caspases 8 et 10 qui possèdent un domaine DED. Les caspases de classe III comprennent les caspases effectrices apoptotiques 3, 6 et 7 et contiennent un petit prodomaine. Ces caspases doivent être clivées pour devenir actives.

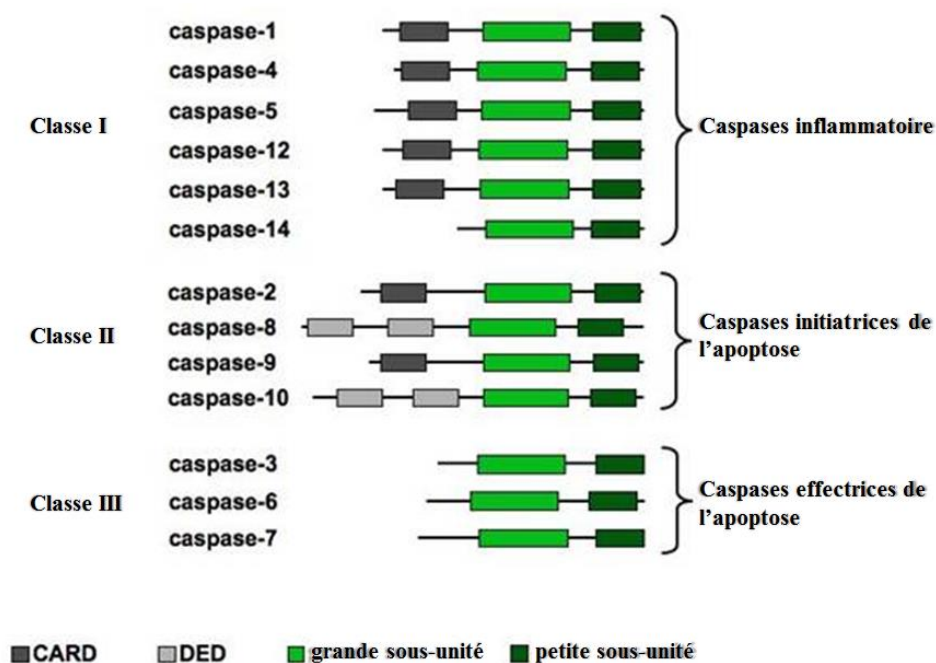


Figure 17 : les caspases chez les mammifères (Adaptée de <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/forro-gabriella-2009-12-02/HTML/image004.jpg>)

Bien que les caspases soient principalement impliquées dans l'apoptose et le renouvellement cellulaire, elles sont également essentielles pour de nombreux processus vitaux. Les caspases sont nécessaires dans le système immunitaire, pour la maturation des lymphocytes et la perturbation de leurs activités peut conduire au développement de tumeurs, des maladies immunitaires et à la maladie d'Alzheimer.

Conclusion :

Les protéases jouent un rôle vital dans de nombreux processus physiologiques et cellulaires. Elles sont essentielles pour la prévention de l'accumulation des protéines anormales dans les cellules. Les activités protéolytiques anormales sont associées au développement de nombreux états pathologiques.

5. Protéolyse et pathologies hépatiques

A l'exception de l'étude menée par Bax et al. (2012) qui a montré une augmentation de l'activité des calpaïnes chez les canards gavés, à notre connaissance, les modifications d'expression ou d'activité des protéases dans le foie des palmipèdes n'ont pas été étudiées. Dans la partie suivante, nous allons exposer les relations entre la stéatose (et d'autres états pathologiques) et la protéolyse hépatique développée dans toutes sortes d'espèces.

Les calpaïnes sont connus pour être impliquées dans les processus de lésions hépatiques (Sakon et al., 1998), et une augmentation de leur activité semble être associée à différentes maladies hépatiques. L'analyse de foie par western blot chez des patients atteints d'une hépatite chronique, la cirrhose du foie ou la jaunisse obstructive, a mis en évidence la présence de la forme intermédiaire (active) de la μ -calpaïne. En revanche, seule la forme proactive de la μ -calpaïne a été observée dans les tissus du foie issus des sujets sains. L'activation de la μ -calpaïne dans les hépatocytes a également été confirmée par immunohistochimie (Sakon et al., 1998).

Des élévations des niveaux d'expression et/ou d'activité des calpaïnes peuvent également résulter du développement de la stéatose hépatique. En effet, l'étude du protéome hépatique chez des personnes atteintes de la stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD) montre une augmentation (x 1.7) de l'expression de la sous-unité calpaïne par rapport aux sujets sains (Rodriguez-Suarez et al., 2010).

Ces résultats sont en accord avec l'étude portant sur les relations entre l'activité de la calpaïne et l'hyperhomocystéinémie. L'hyperhomocystéinémie est une maladie résultant de l'accumulation de l'acide aminé homocystéine à la suite d'une déficience en cystathionine beta

synthase (CBS). Cette anomalie génétique est couplée au développement de maladies hépatiques.

Dans le cas d'une stéatose hépatique causée par une hyperhomocystinémie chez les souris CBS-déficientes, l'activité de la calpaïne est 30% plus élevée que chez des souris sauvages (Hamelet et al., 2009). Cette étude suggère que la stéatose stimule donc la protéolyse via les calpaïnes ce qui induit la prolongation des épisodes inflammatoires, favorisant ainsi des lésions tissulaires.

Ceci a été également démontré dans le cas d'une stéatose induite par une intoxication avec le tétrachlorométhane (CCl₄). Chez le rat, un traitement avec du CCl₄ est létale quand la quantité dépasse les 3 mg/kg. Cependant, une faible dose (2 mg/kg) de CCl₄ induit le développement de lésions hépatiques qui continuent à progresser longtemps après le retrait de cette hépatotoxine.

Dans leur étude sur l'intoxication par le CCl₄, Limaye et al. (2003) montrent que les calpaïnes sont responsables de la poursuite de la progression du traumatisme hépatique. En effet, les calpaïnes libérées des hépatocytes morts dans la circulation systémique, attaquent les hépatocytes normaux du voisinage (figure 18). Ils démontrent aussi que l'inhibition de l'activité des calpaïnes par l'administration de CBZ (*N*-carboxybenzo-valine-phenyl alanine methyl ester, un inhibiteur des calpaïnes), une heure après l'intoxication atténue les lésions chez les rats ayant reçus une dose non-létale et sauve 75% de ceux ayant reçus une dose létale.

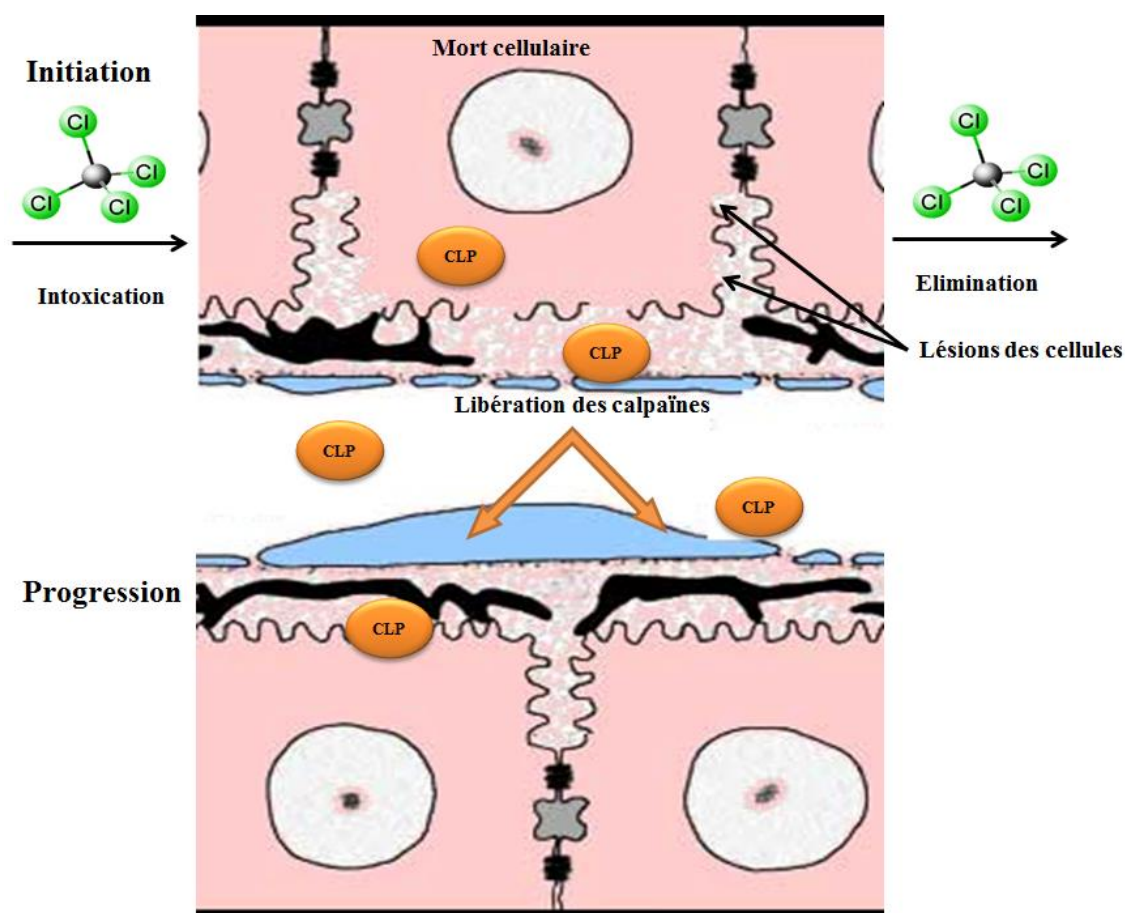


Figure 18 : Mécanisme de la toxicité et sa progression due à la libération des calpaïnes

L'effet de l'administration de tétrachlorométhane a été également testé sur l'expression des MMPs par De Meijer et al. (2010). Comme pour les calpaines, les MMPs sont surexprimées parallèlement au développement de l'inflammation et des lésions hépatiques (x20, x10, x2, x5 et x20 pour les MMP-2, -3, -8, -9 et 13 respectivement). Cependant, l'inhibition des MMPs a causé l'aggravation de la fibrose hépatique, ce qui a contrebalancé tout effet anti-inflammatoire bénéfique. En effet, chez des sujets sains, il existe une balance entre la fibrogenèse et la fibrolyse dans la matrice extracellulaire hépatique. La dégradation de la MEC est assurée par les différentes MMPs ayant chacune une spécificité de substrat (Han, 2006). Une réduction de la fibrolyse par une inhibition des MMPs ou bien une surélévation de la fibrogenèse conduit à l'accumulation de la MEC et donc au développement d'une fibrose

hépatique. Il a été remarqué que l'activité de la MMP-2 augmente en réponse à un dommage hépatique. Cette production précoce de la MMP-2 est considérée comme étant un marqueur de la fibrose hépatique et a pour rôle de favoriser la mobilité des cellules pour faciliter le traitement des lésions (Herbst et al., 1991). De même Wu et al. (2008) ont montré que la fibrose hépatique induite par la contamination arsénique (As^{3+} ou As^{5+}) dans l'eau potable est aggravée par un régime alimentaire contenant 20% de matières grasses ajoutées chez les souris. Ils ont aussi conclu que l'expression des gènes codant pour les MMP-2 et 9 ainsi que leurs inhibiteurs TIMP-1 et 2 a été augmentée (Wu et al., 2008). La surexpression de ces deux formes de MMPs a été enregistrée dans plusieurs études. Elle a été remarquée chez les rats suite à une alimentation avec un régime hypercalorique qui a conduit au développement d'une stéatose hépatique non-alcoolique (Liu et al., 2012). Les niveaux de l'expression ainsi que ceux de l'activité de ces deux MMPs semblent augmenter chez l'homme et les souris atteints d'une stéatose hépatique alcoolique (Chung et al., 2009). L'inhibition des MMPs conduit à la réduction de la lipogenèse de novo et à la prévention de la stéatose hépatique (Alwayn et al., 2006). Des niveaux élevés de la MMP-9 ont aussi été enregistrés dans des cas de stéatohépatite-non-alcoolique (NASH), d'inflammation et de fibrose du foie (Wanninger et al., 2011) et en cas de métastase hépatique (Nikkola et al., 2005). Ainsi, l'inhibition des MMPs sert de moyen thérapeutique pour guérir l'inflammation du foie, leur addition ayant montrée des résultats intéressants en ce qui concerne le traitement de la fibrose (Iimuro et Brenner, 2008 ; Siller-López et al., 2004).

Dans la plupart des études de stéatose hépatique, les modifications d'expression ou d'activité des MMPs tendent vers une augmentation. Cependant, Boden et al. (2008) montre que l'hyperinsulinémie, en présence ou en l'absence d'une résistance à l'insuline, a entraîné une diminution des activités de trois MMP hépatiques, MMP-2, MMP-9 et MT1-MMP, qui sont

impliquées dans la fibrose hépatique et a augmenté la concentration tissulaire de leurs principaux inhibiteurs, TIMP-1 et TIMP-2.

Alors que les activités des MMPs semblent donc stimulées suite une intoxication alcoolique (Chung et al., 2009 et Skrzydlewska et al., 1997) ont montré que celles des cathepsines semblent diminuées. Cette diminution est due à l'oxydation du méthanol en métabolites toxiques qui peuvent endommager les lysosomes et changer la distribution des activités cathepsiques. Les résultats suggèrent que l'activité des cathepsines A, B et C est réduite 24h après l'intoxication et qu'elle est complètement rétablie 7 jours après. Cependant, la même étude ne met pas en évidence une modification de l'activité de la cathepsine D. Ceci peut être expliqué par le fait que contrairement aux protéases ayant un résidu cystéine telles que les cathepsines B et C, il s'agit d'une protéase aspartique moins susceptible aux modifications oxydatives. L'activité de cette protéase aspartique a été aussi mesurée dans le sérum de patients présentant une insuffisance hépatique fulminante. Elle est multipliée par dix chez les patients qui sont décédés et par quatre chez les personnes qui ont survécu à une insuffisance hépatique après un surdosage de paracétamol. Cependant, cette activité a également augmenté chez les patients avec une insuffisance hépatique fulminante due à une hépatite virale à laquelle ils aient plus ou moins bien survécu (Gove et al., 1981).

Beaucoup d'études ont été menées pour examiner l'implication des cathepsines dans le développement des pathologies hépatiques. La majorité s'est concentrée sur la cathepsine B et son potentiel d'implication dans les voies apoptotiques en utilisant soit des souris transgéniques *CtsB*^{-/-}, soit des inhibiteurs de protéase. Dans leur étude, Guicciardi et al. (2000) montrent que la cathepsine B est impliquée dans l'apoptose hépatique par activation des caspases et que sa délétion entraîne une diminution de l'apoptose TNF- α induite (facteur de nécrose tumorale). Par conséquent, les lésions hépatiques sont atténuées et la chance de survie est améliorée chez les souris transgéniques par rapport aux souris sauvages (figure 19).

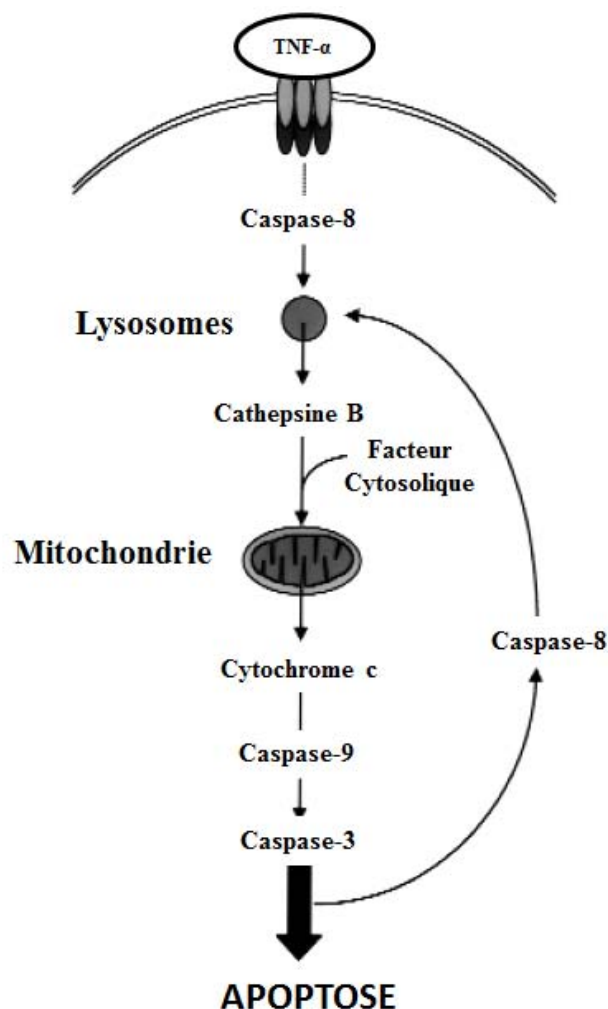


Figure 19 : Implication de la cathepsine B dans la voie de l'apoptose par l'induction de la libération du cytochrome c par la mitochondrie en dégradant des substrats cytosoliques non-identifiés. La libération du cytochrome induit le clive des caspase-9 et 3 suivit par d'autres changement apoptotiques (Guicciardi et al., 2000)

L'inactivation génétique ou pharmacologique de cette protéase a aussi été également validée par Baskin-Bey et al. (2005) qui montrent une atténuation du processus de l'apoptose dans un foie stéatosique suite à des lésions d'ischémie reperfusion induite par la fragilité lysosomale et par conséquent la libération des cathepsines B dans le cytosol. Une autre étude montre que lors de cholestase extra-hépatique chez la souris, des lésions hépatiques, une inflammation et l'élévation des indices de fibrogenèse hépatique sont, en partie, CtsB-dépendante. Par ailleurs, l'inactivation de CtsB avec des inhibiteurs de protéases sélectifs tels

que le R-3032 indique une option thérapeutique potentielle pour les lésions hépatiques cholestatiques, l'inflammation et la fibrose hépatique (Canbay et al., 2003).

Pour étudier les relations entre protéolyse autophagique et métabolisme lipidique, Inami et al. (2011) utilise des souris obèses (ob/ob), ayant une mutation du gène codant pour l'hormone leptine qui contrôle la sensation de la faim. L'observation par microscopie montre que les hépatocytes des souris obèses contenaient moins d'autophagosomes avec des activités cathepsiques. En plus, l'identification par western blot des lysats hépatiques révélait une expression supérieure des cathepsines B et L chez les souris témoins par rapport aux souris obèses (figure 20). Ces résultats suggèrent que la protéolyse par autophagie est réduite par la stéatose hépatique. Dans le cas inverse, la famine a causé l'augmentation de l'autophagie. La réalimentation l'a inhibé et a sensiblement altéré la distribution cellulaire de la cathepsine B dans le foie, résultant en un arrangement linéaire de l'enzyme uniquement sur la périphérie des hépatocytes (Ohshita et al., 1986).

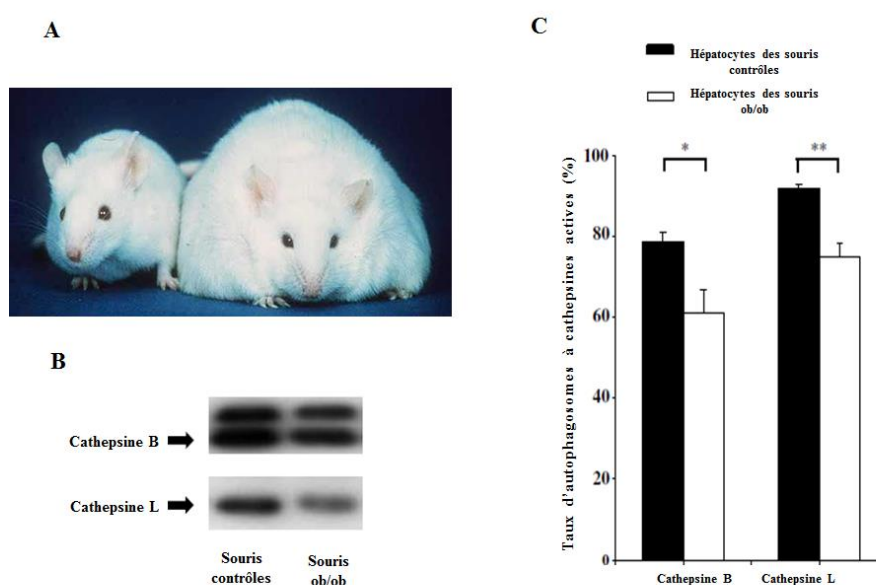


Figure 20 : Stéatose et Autophagie chez les souris ob/ob. (A) à gauche : souris contrôle, à droite souris ob/ob (<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0b/Fatmouse.jpg>). (B) quantification des cathepsines B et L par western blot. (C) taux des autophagosomes contenant des cathepsines B ou L actives (Inami et al., 2011)

Les caspases, ou protéases de l'apoptose, peuvent aussi être impliquées dans les pathologies hépatiques. Ferreira et al. (2011) ont remarqué que l'obésité morbide accompagnée d'une stéatohépatite conduisait à une apoptose hépatique. Cette dernière est caractérisée par la fragmentation de l'ADN et une augmentation de l'activité des caspases -2 et -3. L'activité de la caspase-3 a été signalée pour être surexprimée dans le cas de stéatose hépatique chez les souris (Hamelet et al., 2009) et l'exposition des hépatocytes à l'acide palmitique chez les oies (Pan et al., 2010). Finalement, Pan et al. (2007) montre que l'inhibition du protéasome aide à la prévention de la stéatose hépatique induite par d'administration de CCl₄.

Conclusion :

En général, on remarque que les altérations des activités protéolytiques tendent vers une augmentation quelle que soit la nature de l'état pathologique hépatique. Cependant, il existe quelques exceptions où une diminution des activités protéolytiques a été signalée (Ohshita et al., 1986 ; Boden et al., 2008). La détection de niveaux anormaux de ces enzymes peut signaler une souffrance hépatique. Cependant, on en connaît très peu sur leur implication dans la stéatose hépatique non pathologique.

C'est la raison pour laquelle nous avons conduit ces travaux sur les études de protéases dans le cas de stéatose hépatique d'origine alimentaire chez les canards.

Nous intéresserons aux liens pouvant exister entre protéolyse et qualité du foie gras en appliquant différents traitement de refroidissement après l'éviscération pour voir si dans le foie on retrouve le même effet des protéases sur la texture que celui qui a été identifié dans le muscle (Grossi et al., 2012 ; Martinez et al., 2011). Le but est aussi de valider l'hypothèse émise par Théron, (2011) qui suggère que les foies présentant un taux de fonte élevé présentent des activités protéolytiques plus intenses.

MATERIELS ET METHODES

1. Introduction

Trois expériences indépendantes ont été conduites pour ces travaux de thèse. La première avait pour but de comparer la réponse des protéases hépatiques à la stéatose chez deux types génétiques de canards qui sont connus pour avoir une aptitude différente au gavage (Pékin vs. Barbarie). La deuxième visait à étudier l'effet de différents traitements thermiques post mortem et de stockage sur les activités protéolytiques et sur les qualités du foie gras. La troisième expérience avait pour but de comparer les activités protéolytiques de deux groupes de foies gras ayant des taux de fonte différents. Pour la deuxième et la troisième expérience nous avons choisi de travailler avec des lots commerciaux pour nous mettre dans un contexte le plus proche possible de ce qui se passe sur le terrain. De nombreuses mesures sont communes ou spécifiques des différentes expérimentations comme l'indique le tableau 7.

Tableau 7: Différentes analyses faites sur les échantillons des 3 expérimentations

| Analyses | | première expérience | deuxième expérience | troisième expérience |
|--------------------------|--|------------------------|-----------------------------|---|
| Analyses protéomiques | Zymographie | Oui | Oui | Oui |
| | SDS Page | - | Oui | - |
| | Identification des protéines par spectrométrie de masse | - | Oui | - |
| Analyses biochimiques | Matière sèche | - | Oui | Oui |
| | Lipides | - | Oui | Oui |
| | Matière azotée | - | Oui | - |
| Mesures de qualité | estimation du taux de fonte | - | Oui (Test de verrine) | Oui (Micro test de fonte + test de faisselles) |
| | Texture | - | Oui | - |

2. Rendement Technologiques

2.1. Test de verrine

Ce test consiste à mettre 180 g de foie gras prélevé de la partie supérieure du grand lobe dans des verrines de 200 ml. Après autoclavage à 105°C, les verrines seront stockées à température ambiante pendant deux à trois mois. A l'issue de cette période, on sort le foie de la verrine et on gratte la graisse exsudée. La fonte représente donc la différence entre le poids du foie avant et après grattage en pourcentage du poids initial.

$$\% \text{Fonte} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

2.2. Micro-test de fonte

Le micro-test de fonte est un test qualitatif subjectif. Il sert à se donner une idée globale mais rapide du taux de fonte. Il consiste à placer 10 g de foie gras dans des coupelles métalliques, à les chauffer dans un four à 80°C pendant 15 min, puis à évaluer visuellement la fonte des lipides. Ce test est pratiqué par certains industriels et semble être un bon indicateur pour sélectionner les foies gras entiers avant la transformation.

2.3. Test de la faisselle

Ce test est un compromis entre rapidité et précision. Il consiste à placer 100 g de foie gras frais dans un panier en plastique perforé. Ce panier est ensuite placé dans un autre pot vide. Les pots sont cuits au bain-marie, à 85°C pendant 60 min. La fonte représente donc la différence entre le poids du foie avant et après cuisson en pourcentage du poids initial.

3. Mesures Biochimiques

3.1. Détermination du taux de matières sèches

La détermination du taux de matière sèche est effectuée par la dessiccation du broyat à l'étuve pendant 24 heures. Afin d'augmenter les surfaces d'échange, du sable est ajouté à la coupelle. Avant la pesée finale de l'échantillon, la coupelle sera placée dans un dessiccateur à température ambiante. Le taux de matière sèche représente alors $\text{poids sec} / \text{poids initial} \times 100$, et est exprimé en pourcentage du poids de foie frais (J.O.C.E, 1971).

3.2. Détermination du taux des lipides

L'extraction des lipides est réalisée selon la méthode décrite par Folch et al. (1957). Les lipides totaux sont extraits à froid à raison de 1 gramme de broyat dans 50 ml de mélange chloroforme / méthanol (2:1, V/V) et homogénéisés à l'aide d'un homogénéiseur de type 'Polytron'. Ce mélange est maintenu à 4°C pendant une nuit afin d'optimiser l'extraction. Après filtration, la séparation des phases est assurée par l'ajout d'une solution de chlorure de sodium

pour former une solution diphasique. La phase inférieure chloroformique contient les lipides extraits et est soutirée et filtrée sur papier filtre Whatman 1PS. Afin de capter toute molécule d'eau subsistante, une faible quantité de sulfate de sodium sera ajoutée. Après l'évaporation de la phase chloroformique la quantification des lipides totaux (exprimés en pourcentage du poids de foie) est déterminée selon la formule suivante:

$$\text{Lipides totaux} = ((2/3 * C_{\text{chloroforme-méthanol}} * \text{Masse lipides extraits}) / \text{Masse Broyat} * V_{\text{d'évaporation}}) * 100 \text{ (Annexe 1)}.$$

3.3. Dosage du taux de matières azotées totales

Le taux de MAT est déterminé par la méthode de Dumas (AFNOR NF V 18-120 1997b) à l'aide d'un appareil Leco auto-analyser (model FP-428, Leco Corp., St Joseph, MI, USA). La technique implique une combustion totale à 850°C en présence d'oxygène de la matrice du foie gras contenu dans une feuille d'étain. Les gaz et les sous-produits de la combustion sont condensés à 6°C et homogénéisés. Une partie aliquote est prélevée et entraînée par un courant d'hélium à travers différents supports assurant une réduction du NO en N₂ et la captation du CO₂ et d'H₂O. L'azote est alors détecté et quantifié à l'aide d'un détecteur calorimétrique. L'EDTA (acide éthylène diamine tétracétique) est utilisé pour la calibration. La teneur en MAT (Matière Azotées Totales) a été estimée par le calcul suivant : MAT= N x 6,25. Elle a été exprimée en pourcentage du poids de foie.

4. Analyses Protéomiques

4.1. Extraction et dosage des protéines

L'extraction des protéines est réalisée selon les méthodes décrites par Kizaki et al. (2008) pour les gélatinases (MMP et Cathepsines ; Annexe 2) et Raser et al. (1995) pour les calpaïnes (Annexe 3). Brièvement, dans des eppendorfs de 2 ml, un tampon de lyse adapté à la protéase recherchée est rajouté à une quantité de foie gras broyé dans de l'azote liquide, auquel on rajoute deux billes en verre. L'ensemble est homogénéisé pendant 20 secondes grâce au système d'agitation à bille FAST-PREP 24 (MP Biomedicals, Illkirch, France). Ensuite les tubes sont centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Une phase supérieure de matière grasse sera donc formée, on l'enlève et on répète l'étape précédente. Le surnageant, correspondant à la fraction de protéines soluble est prélevé et conservé à -80°C.

4.2. Dosage des protéines

La teneur en protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976). La gamme étalon est préparée avec de l'albumine sérique bovine dans les mêmes conditions que les échantillons. Après une incubation de 15 min à l'obscurité dans le réactif Bradford (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France), l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 595 nm contre un blanc d'eau. Les concentrations en protéines des échantillons sont calculées à partir de la droite d'étalon (Annexe 2 et 3).

4.3. Electrophorèses

4.3.1. Zymographie

Les activités protéolytiques contenues dans le foie gras ont été étudiées par zymographie. Le principe de cette technique consiste en une séparation électrophorétique des protéines dans un gel polyacrylamide imprégné d'un substrat protéique spécifique à la protéase (gélatine pour les MMPs et les cathepsines et caséine pour les calpaïnes). Les protéases sont mises en évidence par leur capacité à dégrader leur substrat, ce qui se traduit après coloration des gels, par des bandes translucides sur un fond bleu (Figure 22) (Annexe 4, 5 et 6).

4.3.1.1. Préparation des échantillons

Les échantillons sont dilués dans du tampon 'de dépôt' contenant pour les calpaïnes du β -mercaptoéthanol (ayant comme rôle de réduire les ponts disulfures) et du SDS pour les gélatinases (conférant aux protéines une charge négative et donc une meilleure qualité de migration).

4.3.1.2. Séparation des protéines

Les échantillons sont déposés sur un gel de concentration (5% d'acrylamide-bisacrylamide) coulé en haut du gel de séparation pour permettre une entrée homogène de l'échantillon dans ce dernier. Le pourcentage d'acrylamide-bisacrylamide choisi pour les gels de séparation dépend de la taille de la protéase considérée. La séparation des protéines se fait à 4°C pour éviter leur dégradation et dans un tampon de migration adapté.

4.3.1.3. Activation des protéases

Après l'électrophorèse, le gel est placé, sous agitation, dans un tampon de rinçage pendant environ une heure. Cette étape permet d'éliminer tout agent dénaturant (Ex: SDS). Les gels sont ensuite incubés pendant une nuit à 37°C dans du 'tampon d'activation' ayant un pH et une composition chimique adéquats pour permettre la renaturation et l'activation de la protéase considérée.

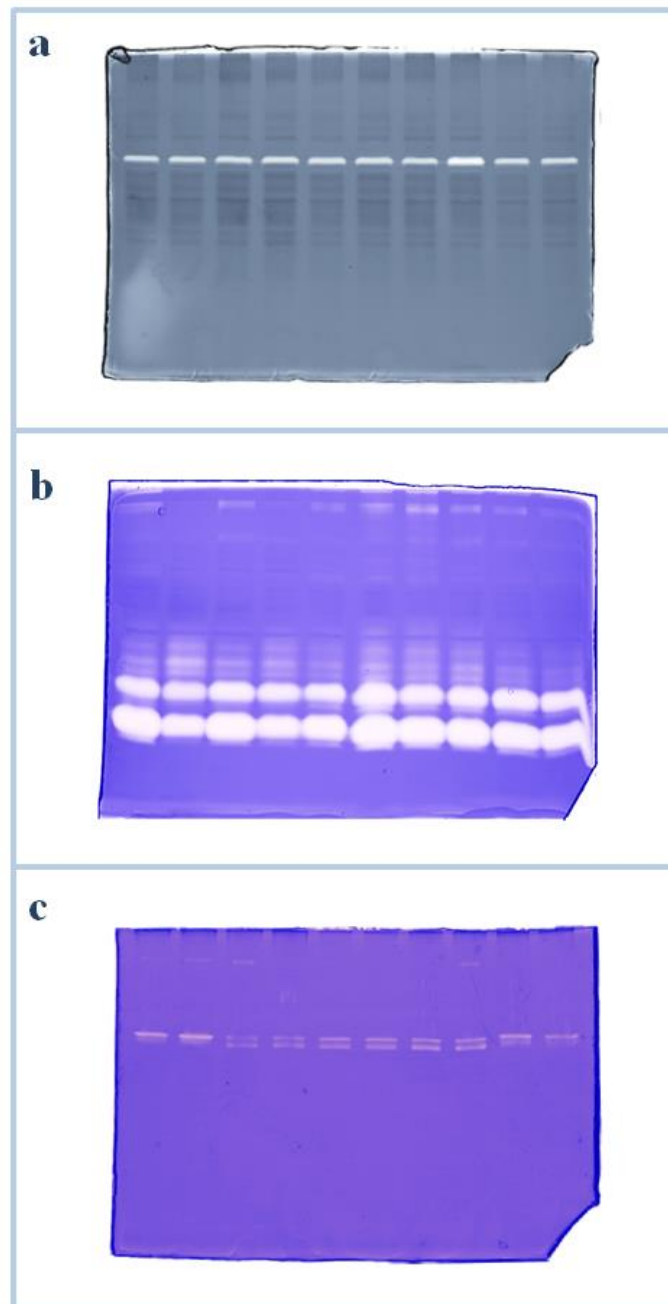


Figure 21 : Zymogrammes , A : MMP-2, B : Cathepsines et C : calpaïnes

4.3.1.4. *Coloration des gels*

La coloration des gels est effectuée en utilisant une solution de Commassie Brilliant Blue (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) pour les cathepsines et les calpaïnes, et le naphthol blue black pour les MMPs pendant 2 heures à température ambiante et sous agitation. La solution colorante contient 45% d'éthanol (pour précipiter les protéines) et 10% d'acide acétique (pour fixer le colorant). Après décoloration, la digestion du substrat protéique par les protéases apparaît comme des bandes transparentes sur un fond bleu.

4.3.1.5. *Analyse d'images*

Selon la procédure décrite par Bax et al. (2012), les gels sont scannés en utilisant le logiciel Platinum ImageMaster (GE Healthcare, Uppsala, Suède). Chaque gel contient un pool de tous les échantillons qui est utilisé comme étalon interne. L'activité relative des protéases est calculée en exprimant l'intensité et le volume des bandes principales de chaque échantillon par rapport à celles correspondantes dans le pool de chaque gel. On obtient donc une valeur relative de l'activité de la protéase considérée.

4.3.2. *SDS-Page*

L'étude du profil protéique se fait par la méthode SDS-PAGE, en utilisant les échantillons de l'extraction des calpaïnes. Toutes les étapes sont identiques à celles décrites pour la technique de zymographie monodimensionnelle à l'exception de l'activation qui est

absente. Les gels sont donc colorés sur la nuit directement après la séparation des protéines par électrophorèse, puis le gel est décoloré (figure 23) (Annexe 7).

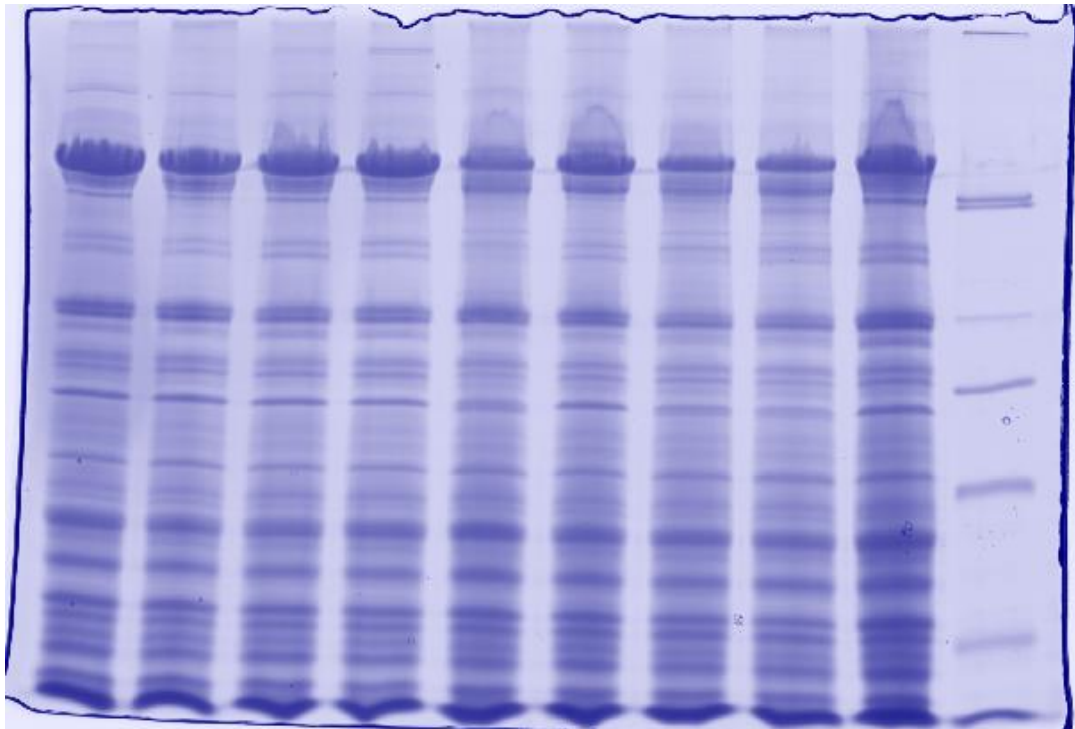


Figure 22: Gel SDS-PAGE

4.3.2.1. Analyse d'image

L'analyse d'image des gels SDS-PAGE est effectuée en utilisant le logiciel Image Studio Lite. Seules les bandes de protéines qui semblaient différentes entre les différents groupes ont été analysées. Ces bandes d'intérêt sont sélectionnées et quantifiées en considérant leur intensité moyenne \times leur surface \times l'épaisseur du gel. La valeur obtenue est ensuite normalisée en la divisant par celle correspondante au niveau du pool.

4.3.2.2. Identification des protéines

Les bandes d'intérêt ont été excisées pour être identifiées par spectrométrie de masse (Plateforme d'Etude du Métabolisme/ Composante Protéomique, INRA de Clermont-Ferrand Theix). Après digestion des protéines par la trypsine, les peptides sont séparés et analysés par nano-LC-MS/MS, grâce au système Ultimate 3000 (Dionex, Amsterdam) couplé à un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Les spectres MS/MS obtenus sont comparés aux banques de données *Gallus Gallus* (Mascot: Matrix Science Co., UK) et *cairina moschata* – *Anas platyrhynchos* (NCBI: National Center for Biotechnology Information).

5. Analyse statistiques

L'ensemble des analyses statistiques a été effectué grâce au logiciel SAS (détails Article 1, 2 et 3).

RESULTATS

Article 1

Altérations des activités protéolytiques suite au gavage chez les canards de Barbarie et les canards Pékin

Accepté dans Poultry science

L'objectif de ce premier essai était d'étudier l'effet du gavage sur les activités protéolytiques chez les canards. On a choisi de travailler sur des canards de Barbarie et des canards Pékin qui sont connus pour avoir des différentes aptitudes au gavage.

18 canards Pékins et 19 canards Barbaries (mâles), ont été élevés jusqu'à l'âge de 81 jours selon des pratiques standards. À l'âge de 81 jours, dix canards de Barbarie et dix Pékin (98j G) ont été gavés, le reste des animaux a été maintenu dans les conditions précédentes (98j M) jusqu'à l'âge de 98 jours. Tous les canards ont été abattus 10 heures après le dernier repas. Les poids vifs des canards ainsi que ceux des foies chauds ont été enregistrés.

Nos résultats montrent que pendant le développement de la stéatose hépatique induite par le gavage des canards, les activités globales des protéases s'adaptent à la forte augmentation du métabolisme dû à des entrées élevées de glucides. En réponse, les protéases ont tendance à réduire leurs activités sans doute pour faciliter l'adaptation cellulaire nécessaire à la synthèse, l'exportation et le stockage des lipides néo-synthétisés. Bien que les canards de Barbarie soient considérés comme plus aptes à la production de foie gras que les canards Pékin, cela ne transparaît pas très fortement à travers le niveau d'activité des protéases hépatiques.

Proteolytic activity alterations resulting from force-feeding in Muscovy and Pekin ducks.

S. Awde,^{†*‡} N. Marty-Gasset,^{*,†,‡} J. Wilkesman,[§] and H. Rémignon^{†*‡¹}

^{*}INRA, UMR1289 TANDEM, F-31326 Castanet-Tolosan, France ;

[†]Université de Toulouse INPT ENSAT, UMR1289 TANDEM, F-31326 Castanet-Tolosan, France ;

[‡]Université de Toulouse INPT ENVT, UMR1289 TANDEM, F-31076 Toulouse, France ;

And [§]Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias y Tecnologia, Departamento de Quimica,
Valencia, Venezuela

ABSTRACT We investigated liver protease activity in force-fed (**FF**) and non-force-fed (**NFF**) ducks using zymography gels to better understand mechanisms underlying liver steatosis in palmipeds. Male Muscovy and Pekin ducks were slaughtered before and after a short period (13 days) while they were conventionally fed or force-fed. The force-fed regime contained a high level of carbohydrates and was delivered in large doses. Main hepatic proteases (MMP-2, calpains and cathepsins) were extracted from raw liver and specifically activated within electrophoretic gels. Both **FF** Muscovy and Pekin ducks presented higher liver and body weights associated with lower MMP-2 and m-calpain hepatic activities. On the other hand, hepatic cathepsin activity was not affected by force feeding. It was concluded that Muscovy and Pekin duck hepatic proteases are affected similarly by the force feeding. Thus, this cannot explain differences observed between Muscovy and Pekin ducks regarding their ability to develop hepatic steatosis generally reported in literature.

Key words: MMP-2, calpain, cathepsin, force feeding, liver, duck.

INTRODUCTION

In humans, liver steatosis can be caused by malnutrition, genetics, drugs or alcohol abuse (Lieber et al., 1989; Bosma et al., 1994; Hooper et al., 2011). Thereafter, steatotic livers may progress from simple fatty livers to steatohepatic, fibrotic or cirrhotic livers which might lead to liver failure and hepatocellular carcinoma (Baffy et al., 2012). However in birds we must distinguish between the fatty liver pathological steatosis (FLKS and FLHS syndromes, for a review see Whitehead, 1979) and the one that naturally occurs in some migratory species of palmipeds such as the grey goose (*Anser anser*) or ducks (Guy et al., 2012). Since ancient Egyptian times, these birds' ability to store large quantities of lipids in their liver and adipose tissues has been exploited by humans to produce fattened poultry. Today, livers of such palmipeds, once force-fed, are called "foie gras" and are mainly produced in France (19,450 t in 2012, 75% of the world production).

The reversibility of the hepatic steatosis in force-fed palmipeds has been demonstrated to prove the non-pathological origin of this particular physiological state. Nevertheless, the susceptibility to force-feeding leads to various degrees of steatosis developments and varies not only among species (ducks vs geese for example) but also among different respective breeds (Chartrin et al., 2006; Liu et al., 2006). While a few breeds tend to store excessive fat, mainly in their adipose tissue and their liver (*i.e.* Pekin ducks or *Anas Plathyrincos*), others concentrate it principally in their hepatocytes (*i.e.* Muscovy or mule ducks). Many studies have already compared growth performances of those breeds and reported that hepatic steatosis development can be explained by a greater or lesser ability of the liver, while exposed to highly energetic diets, to export neosynthetized lipids (Hermier et al., 1991; Hermier et al., 2003).

Beside their well-known ability to hydrolyze proteins, proteases may be involved in more complex physiological reactions and highly regulated cascades. Modifications of proteolytic activities can also be a part of various signaling pathways. For example, they are known to play a central role in the execution of apoptosis. Although caspases are considered to be the most important apoptotic

proteases, other proteases such as calpains, cathepsins and matrix metalloproteases (MMPs) are also involved in programmed cell death (Guicciardi et al., 2000; Levine and Kroemer, 2008).

In the present study we used zymography techniques to reveal modifications in activities of three proteolytic enzymes after the development of hepatic steatosis induced by force-feeding in two genetic types of ducks (Muscovy and Pekin) known to be more or less prone to develop it. We hypothesized that different modulations of proteolytic activities after force-feeding could explain differences in hepatic enlargement imposed by force-feeding.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Muscovy (n=19) and Pekin ducks (n=18), hatched on the same day, were reared in similar conditions until the age of 12 wks. All the breeding was performed in a conventional poultry house, following standard practices and under natural conditions of light and temperature, at the INRA (SEPGF) poultry research station in Artiguères (France). At the age of 12 wks, Pekin and Muscovy ducks were divided into two groups each. Ten Muscovy and eight Pekin ducks were force fed (**FF**) for 13 days, in individual cages, with a soaked-corn mixture (25% corn grain, 35% corn flour and 40% water, 3,330 kcal/kg, 8.28% crude proteins and 3.38% lipids according to Chartrin et al., 2006) twice daily. During the force-feeding period, daily delivered quantity of feed progressively increased from 200 g to 1 kg. Remaining birds were continuously fed *ad libitum* with a standard growing diet (2,900 kcal/kg, 15.2% crude proteins and 2.7 % lipids) until the same slaughtering age (98 days) and were used as controls (Non-Force-Fed or **NFF** group). Water was provided *ad libitum* for all birds.

At the age of 98 days the ducks were slaughtered by severing the jugular veins approximately 10 hours after their last meal in a conventional poultry house. 20 minutes after the bleeding started, livers were removed from plucked carcasses and weighed. Liver samples were then harvested, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. Animals' live body weights (just before the bleeding) and liver weights (just after the evisceration) were recorded for all animals.

The experiments described here fully comply with legislation on research involving animal subjects according to the European Communities Council Directive of November, 24 1986 (86/609/EC). Investigators were certificated by the French governmental authority for carrying out these experiments (accreditation n°31-11 43 501).

Mono-dimensional Zymography

To obtain a good sampling and a correct statistical analysis, a duplicate was analyzed for each sample.

Protein extraction Acylamide, BisAcrylamide and Coomassie Brilliant Blue were purchased from Bio-Rad (Marnes la Coquette, France). All other chemicals were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Livers were first crushed into powder in liquid nitrogen. Liver lysis was then achieved using Fastprep-24 (MP BioMedicals, Illkirch, France) for 20 seconds. Following Kizaki et al. (2008), 1.5 mL of gelatin-degrading proteases extraction buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0.05% Brij 35, 10 µg/mL Leupeptin, 1 mM PMSF) and 1.2 mL of casein-degrading proteases extraction buffer (50 mM Tris Base pH 8.3, 20 mM EDTA, 10 mM EGTA, 0.1% β-mercaptoethanol) were added to 75 and 300 mg of liver tissue respectively in order to extract gelatin- and casein-degrading proteases respectively. Samples were then centrifuged at 12 000 g at 4°C for 15 min and the fat cake (extracted lipids) was removed. This operation was repeated to make sure of getting a good separation of soluble proteins from lipids and other cell components. Finally, supernatants were collected and aliquoted in small tubes stored at -20°C. Total protein concentration in protein extracts (supernatants) was determined using Bradford's method with BSA as protein standards (Bradford, 1976).

MMP-2 Gelatin Zymography Matrix Metalloprotease 2 (**MMP-2**) gelatinolytic activity was detected according to Kizaki et al. (2008). Briefly, samples containing 40 µg of proteins were mixed (1/4 vol/vol) with the sample buffer (150 mM Tris Base pH 6.8, 30% glycerol, 4% SDS, 40 µM ZnCl₂

and 0.1% Bromophenol Blue) and loaded onto 12% polyacrylamide gels containing 0.2% gelatin A (1 mm spacers; 5 mL / mini-gel from Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Gels were then run under denaturing but non-reducing conditions (4°C, 125 V, 2h). Proteolytic activity was finally achieved by washing gels for 30 min in TBS-T buffer (20mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween) and 1h in the incubation buffer (50 mM Tris HCl pH 7.5, 6 μ M ZnCl₂, 5 mM CaCl₂, 0.05% Brij, 0.02% NaN₃) with 2.5% Triton X-100. Gels were incubated overnight (18 h) at 37°C in the same buffer but without Triton-X 100. Finally, zymograms were stained with a solution containing 0.1% Naphthol Blue Black for 2h, and then washed with a destaining solution (45% ethanol and 10% acetic acid). Digestion of the gelatin due to MMP-2 activity appeared as white bands on a dark blue background.

Cathepsin Gelatin Zymography Cathepsin activity was detected according to Afonso et al. (1997). Briefly, samples containing 15 μ g of extracted proteins were loaded onto 0.2% gelatin gels containing SDS (12%) and run as previously described. The resulting gels were then washed twice for 30 min in a 0.1 M sodium acetate buffer solution (pH 5.2) containing 2.5% Triton X-100. Gels were then incubated overnight with the incubation buffer (0.1 M sodium acetate + 2 mM DTT) at 37°C. They were then stained in a 0.5% Coomassie Brilliant Blue R-250 solution for 2h then washed in a destaining solution (45% ethanol and 10% acetic acid). Digestion of the gelatin due to cathepsins activities appeared as white bands on a blue background.

Calpain Casein Zymography : Using the method of Raser et al. (1995), calpain activity was detected on 10% polyacrylamide gels containing 0.2% casein and previously loaded with samples containing 40 μ g of proteins diluted (Vol/Vol, 1/4) in the calpain sample buffer (150 mM Tris base, 20% glycerol, 0.05% Bromophenol Blue, 0.75% β -mercaptoethanol). Gels were run in a calpain running buffer (192 mM glycine, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 25 mM Tris base, pH 8.3) for 2 hours (4°C, 100 V). Gels were then washed twice in a calpain activation solution (20 mM Tris base, pH 7.4, 10 mM CaCl₂) for 30 min and incubated overnight at 37° C in the same buffer containing 10 mM DTT. Finally, gels were stained and destained as previously described for

cathepsins. Digestion of the casein due to calpain activity appeared as white bands on a blue background.

Image Analysis

Using the procedure described by Bax et al. (2012), gels were scanned with an Image Scanner III using ImageMaster Platinum software (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Each liver sample was processed individually, and the value of main bands was calculated by using Image Master Platinum application. Each gel also included a pool of all the samples run and was used as an internal standard. Protease activity was considered as the combination of computerized measurements of both intensity and volume of main bands for each sample. Relative protease activity was estimated as protease activity / pool activity within each gel.

Statistical analysis

For statistical analysis, the General Linear Model procedure of SAS software (SAS, 2011) was used with a two-way ANOVA with breed and type of diet as main effects. Assuming unbalanced numbers of observations within groups, LSmeans and standard errors values are reported in tables.

RESULTS

Animal Performance

Table 1 reports animal live body weight (**LBW**) and liver weight (**LW**) at 98 days of age for non-force-fed (**NFF**) and force-fed (**FF**) Muscovy and Pekin ducks. At this age, LBW is significantly higher in **FF** than in **NFF** for both Muscovy and Pekin ducks. Similarly, LW was 5.5- and 6.0-fold higher in **FF** than in **NFF** Muscovy and Pekin ducks respectively. LBW was higher for Muscovy than Pekin ducks for **FF** or **NFF** groups, while it was similar at the beginning of the studied period (4,639

vs. 4,527 g for Muscovy and Pekin ducks respectively). **FF** Muscovy livers were 1.44 times heavier than Pekin ones with less weight variability (11.3 vs. 29.6 % in Muscovy and Pekin FF ducks respectively). The significant interaction ($P<0.01$) between breed and diet indicates that force-feeding did not modify LW identically in the two studied breeds. The weight of the liver always represented a larger part of the body weight in Muscovy than in Pekin ducks.

MMP-2 Gelatin Zymography

The MMP gelatin protease assay permitted the detection of a 72 kDa proteolytic band corresponding to the MMP-2 (Figure 1b). This gelatinolytic activity was inhibited in the presence of EDTA, DTT and in absence of Ca^{2+} ions (data not shown). Table 2 shows that the activity of this protease was significantly decreased by force feeding in both types of duck. It is also noticeable that MMP-2 activity was always higher in Muscovy than in Pekin ducks for both diets.

Cathepsin Gelatin Zymography

Three major proteolytic bands were detected for the cathepsin proteolytic assay. Unlike MMP-2 protease, these activities of cathepsin isoforms were not affected by the addition of DTT or EDTA, but were inhibited in the presence of PMSF (data not shown). Molecular weights of the three detected acidic proteases ranged from ~37 kDa to ~24 kDa (Figure 1c). Unfortunately, no specific antibodies directed against cathepsin isoforms from ducks are commercially available to give a better identification of detected isoforms in the present study. Moreover, an identification test of those cathepsins using mass spectrometry analysis failed to give reliable results, probably because of the non-availability of the full sequence of ducks' genome. We therefore chose not to report the precise identification of the three detected cathepsin isoforms in the present study but to report total cathepsin activity (**CtsT**, Table 2) calculated as the sum of the individually detected activities.

In both studied breeds, proteolytic activities due to force feeding were not greatly affected by the diets.

Calpain Casein Zymography

Calpain proteolytic assays revealed two bands which were active in the presence of 4mM of Ca^{2+} for the upper one and of 10 mM of Ca^{2+} for the lower one (Figure 1d). This indicates that these two bands correspond to the μ - and m-calpain isoforms respectively. The m-calpain is also electrophoretically distinguishable from the μ -calpain because of its higher mobility in the gel (Arthur and Mykles, 2000). To further confirm the identification of these two caseinolytic proteases, effects of calpain inhibitors (leupeptin and E-64 both purchased from Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) were assessed before electrophoresis. As expected, the presence of these calpain inhibitors completely blocked the activity of these neutral cysteine proteases (data not shown).

The μ -calpain activity was unaffected by force feeding in both breeds (Table 2). On the other hand, the activity of the m-calpain was found to be lower in **FF** than in **NNF** Muscovy and Pekin ducks. While the activity of the μ -calpain was significantly lower in Muscovy ducks than in Pekin ducks regardless of the diet; that of the m-calpain was similar for the two breeds. Finally, total calpain activity (**ClpT**) was influenced neither by breeds nor by diets.

DISCUSSION

The choice of Muscovy and Pekin ducks in the present experiment was based on their different susceptibility to develop hepatic steatosis in response to force feeding (Hermier et al., 2003). According to Chartrin et al. (2006), force-fed Muscovy ducks produce bigger and more fattened livers compared to Pekin ducks. Results obtained in this study confirm this hypothesis and indicate that Muscovy ducks are prone to develop bigger livers than Pekin ones in response to force feeding. In consequence, it is generally agreed that the overall liver metabolism of Muscovy ducks better supports high daily intakes than that of Pekin ducks.

Enzymatic activity determination is a commonly used procedure to investigate hepatotoxicity and other liver dysfunctions (Gohda et al., 1984). In this study, we focused on activities of three types

of proteases to determine the possible role of those proteolytic enzymes in the hepatic steatosis development in two different types of ducks.

MMPs are proteases secreted by animal tissues mainly to degrade extracellular matrix (ECM). Thus, during the normal growth of organs, such as the liver, they largely participate in the remodeling of the ECM induced both by cellular hyperplasia and hypertrophy. The present study demonstrates that force feeding significantly alters MMP-2 activity. Thus, in **FF** ducks, observed reductions in MMP-2 activity could indicate an adaptation of the liver metabolism, probably to facilitate the enlargement of hepatocytes due to lipid accumulation. However, if liver pathological fibrosis occurs, an increase of the activity of the MMP-2 could be expected, as reported by Liu et al. (2006) and Wanninger et al. (2011) in NASH (Non Alcoholic Steato-Hepatitis). Also, de Meijer et al. (2010) reported that the inhibition of MMPs has an immediate beneficial anti-inflammatory effect, even though it accelerates liver fibrosis.

Cathepsins constitute a family of lysosomal proteases active at low pH values which are mainly active in renewing intracellular proteins. Thus, whereas a slight increase in their global activity indicates an increase in cellular catabolism, a large increase is generally a sign of large cellular disturbances such as apoptosis and cancer (Guicciardi et al., 2000; Mohamed and Sloane, 2006). In the present study, it is noticeable that global activities of cathepsins were not modified by force feeding.

The ubiquitous and constitutive expression of μ - and m-calpains strongly suggests that they are involved in basic and essential cellular functions (Sorimachi et al., 1997). Calpains have been reported to increase when hepatocytes suffer from different forms of stress and injury (Sakon et al., 1998; Limaye et al., 2003). However in the present study, the liver steatosis development seems to either decrease or not modify calpain activity. This indicates that, even at the end of a significant force-feeding period, hepatocytes from both types of duck are reducing their global protein catabolism, probably to continue to assume the excess of cellular activity caused by the development of the steatosis. This tendency towards a higher anabolism than catabolism during the steatosis development has also been reported by Bax et al. (2012) in a proteomic study conducted during force feeding of Mule ducks. Here, we can hypothesize that hepatocytes are still in a very active state and

that the expected increase in activities of calpains associated with liver injuries might arise only later if the force feeding is prolonged (Kohli et al., 1999; Mehendale and Limaye, 2005).

In conclusion, during the development of the steatosis of the liver induced by force feeding in ducks, activities of main hepatic proteases are adapted to the huge increase of the overall metabolism due to high daily inputs of carbohydrates. In response, proteases reduce their activities probably to facilitate the cellular adaptation necessary to synthesize, export and store neosynthesized lipids. From a genetic point of view, the two studied breeds had no differences in cathepsin activity. However Muscovy ducks had higher MMP-2 activity and lower μ -calpain activity. Although Muscovy and Pekin ducks were reported to have different abilities to develop liver steatosis, their proteolytic activities responded quite similarly to force feeding. This indicates that the ability to develop liver steatosis in response to force feeding cannot be proved to be caused by differences in proteolytic capacity. A study of proteolytic activity evolution during the development of steatosis could be now interesting to better investigate hepatic proteolysis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the technical staff of the TANDEM (INRA/INP-ENSAT/ENVT) lab for assistance during biochemical measurements, the technical staff at the INRA-SEPPG experimental unit in Artiguères (France) for taking care of animals and Pr Davail (UPPA- Université de Pau et des Pays de l'Adour) for facilitating access to samples.

REFERENCES

Afonso, S., L. Romagnano, and B. Babiarz. 1997. The expression and function of cystatin C and cathepsin B and cathepsin L during mouse embryo implantation and placentation. *Dev. Camb. Engl.* 124:3415–3425.

- Arthur, J. S. C., and D. L. Mykles. 2000. Calpain Zymography with Casein or Fluorescein Isothiocyanate Casein. Pages 109–116 in *Calpain Methods and Protocols*. Elce, J.S., ed. *Methods in Molecular Biology*TM. Humana Press, New York.
- Baffy, G., E. M. Brunt, and S. H. Caldwell. 2012. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J. Hepatol.* 56:1384–1391.
- Bax, M. L., C. Chambon, N. Marty-Gasset, H. Remignon, X. Fernandez, and C. Molette. 2012. Proteomic profile evolution during steatosis development in ducks. *Poult. Sci.* 91:112–120.
- Bosma, A., W. F. Seifert, G. C. F. van Thiel-de Ruiter, R. E. W. Van Leeuwen, B. Blauw, P. Roholl, D. L. Knook, and A. Brouwer. 1994. Alcohol in combination with malnutrition causes increased liver fibrosis in rats. *J. Hepatol.* 21:394–402.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
- Chartrin, P., M.-D. Bernadet, G. Guy, J. Mourot, J.-F. Hocquette, N. Rideau, M. J. Duclos, and E. Baéza. 2006. Does overfeeding enhance genotype effects on liver ability for lipogenesis and lipid secretion in ducks? *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 145:390–396.
- De Meijer, V. E., D. Y. Sverdlov, Y. Popov, H. D. Le, J. A. Meisel, V. Nosé, D. Schuppan, and M. Puder. 2010. Broad-Spectrum Matrix Metalloproteinase Inhibition Curbs Inflammation and Liver Injury but Aggravates Experimental Liver Fibrosis in Mice. *Plos One* 5:e11256.
- Gohda, E., J. Nagahama, O. Nakamura, H. Tsubouchi, Y. Daikuhara, and H. C. Pitot. 1984. Increased activities of liver cathepsins T and D in carbon tetrachloride-treated rats. *Biochim. Biophys. Acta* 802:362–371.
- Guicciardi, M. E., J. Deussing, H. Miyoshi, S. F. Bronk, P. A. Svingen, C. Peters, S. H. Kaufmann, and G. J. Gores. 2000. Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J. Clin. Invest.* 106:1127–1137.

- Guy, G., L. Fortun-Lamothe, G. Bénard, and X. Fernandez. 2013. Natural induction of spontaneous liver steatosis in Greylag Landaise geese (*Anser anser*). *J. Anim. Sci.* 91:455–464.
- Hermier, D., G. Guy, S. Guillaumin, S. Davail, J.-M. André, and R. Hoo-Paris. 2003. Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in two species of ducks. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 135:663–675.
- Hermier, D., A. Saadoun, M. R. Salichon, N. Sellier, D. Rousselot-Paillet, and M. J. Chapman. 1991. Plasma lipoproteins and liver lipids in two breeds of geese with different susceptibility to hepatic steatosis: changes induced by development and force-feeding. *Lipids* 26:331–339.
- Hooper, A. J., L. A. Adams, and J. R. Burnett. 2011. Genetic determinants of hepatic steatosis in man. *J. Lipid Res.* 52:593–617.
- Kizaki, K., K. Ushizawa, T. Takahashi, O. Yamada, J. Todoroki, T. Sato, A. Ito, and K. Hashizume. 2008. Gelatinase (MMP-2 and -9) expression profiles during gestation in the bovine endometrium. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6:66.
- Kohli, V., J. F. Madden, R. C. Bentley, and P. A. Clavien. 1999. Calpain mediates ischemic injury of the liver through modulation of apoptosis and necrosis. *Gastroenterology* 116:168–178.
- Levine, B., and G. Kroemer. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132:27–42.
- Lieber, C. S., L. M. DeCarli, and M. F. Sorrell. 1989. Experimental methods of ethanol administration. *Hepatol. Baltim. Md* 10:501–510.
- Limaye, P. B., U. M. Apte, K. Shankar, T. J. Bucci, A. Warbritton, and H. M. Mehendale. 2003. Calpain released from dying hepatocytes mediates progression of acute liver injury induced by model hepatotoxicants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 191:211–226.

- Liu, X., R. He, C. Huang, X. Li, Q. Zhou, C. Wang, N. Zhao, and S. Zhou. 2006. Hepatic Lipogenesis Associated with Biochemical Changes in Overfed Landaise Geese and China Xupu Geese. *Agric. Sci. China* 5:390–396.
- Mehendale, H. M., and P. B. Limaye. 2005. Calpain: a death protein that mediates progression of liver injury. *Trends Pharmacol. Sci.* 26:232–236.
- Mohamed, M. M., and B. F. Sloane. 2006. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6:764–775.
- Morgan, J. B., T. L. Wheeler, M. Koohmaraie, J. W. Savell, and J. D. Crouse. 1993. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in longissimus muscle of young bulls and steers. *J. Anim. Sci.* 71:1471–1476.
- Raser, K. J., A. Posner, and K. K. Wang. 1995. Casein zymography: a method to study mu-calpain, m-calpain, and their inhibitory agents. *Arch. Biochem. Biophys.* 319:211–216.
- Sakon, M., S. Kishimoto, K. Umeshita, H. Nagano, M. Wang, K. Dohno, S. Nakamori, H. Ariyoshi, T. Kawasaki, M. Gotoh, and M. Monden. 1998. Activation of calpain μ in the diseased liver. *Gastroenterology* 114:A1331–A1331.
- SAS 2011. The data analysis for this paper was generated using SAS software, Version 9.3 of the SAS System for Windows. Copyright © 2002-2010 SAS Institute Inc. SAS and all other SAS Institute Inc. product or service names are registered trademarks or trademarks of SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Sorimachi, H., S. Ishiura, and K. Suzuki. 1997. Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J.* 328:721–732.
- Wanninger, J., R. Walter, S. Bauer, K. Eisinger, A. Schäffler, C. Dorn, T. S. Weiss, C. Hellerbrand, and C. Buechler. 2011. MMP-9 activity is increased by adiponectin in primary human

hepatocytes but even negatively correlates with serum adiponectin in a rodent model of non-alcoholic steatohepatitis. *Exp. Mol. Pathol.* 91:603–607.

Whitehead, C. C. 1979. Nutritional and metabolic aspects of fatty liver disease in poultry. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 104:suppl 150–157.

Table 1. Global performance (live body weight or LBW, liver weight or LW and liver/body weight or LW/BW %) of force-fed (**FF**) and control (**NFF**) Muscovy and Pekin ducks. Values are presented as

| Breed | Muscovy | | Pekin | | RMSE ⁽¹⁾ | D ⁽²⁾ | B ⁽³⁾ | D*B ⁽⁴⁾ |
|-----------|------------|------------|------------|------------|---------------------|------------------|------------------|--------------------|
| Diet | NFF | FF | NFF | FF | | | | |
| LBW (g) | 5447 ± 654 | 6568 ± 278 | 4592 ± 570 | 5897 ± 505 | 523 | *** | *** | Ns |
| LW (g) | 82 ± 17 | 452 ± 51 | 52 ± 12 | 314 ± 93 | 55.55 | *** | *** | ** |
| LW/BW (%) | 1.5 ± 0.2 | 6.9 ± 0.9 | 1.1 ± 0.2 | 5.32 ± 1.5 | 0.93 | *** | ** | Ns |

LSmeans ± standard errors.

*, ** and *** for $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$ and $P \leq 0.001$ respectively. Ns for $P > 0.05$.

⁽¹⁾RMSE = Root Mean Square Error. ⁽²⁾D = effect of diet (NFF vs. FF), ⁽³⁾B = effect of breed (Muscovy vs. Pekin), and ⁽⁴⁾D*B = effect of the interaction between the diet and the breed.

Table 2. Relative proteases activity (MMP-2, cathepsin isoforms: Cts1, Cts2, Cts3 and their total sum = CtsT, μ - and m-calpain and their total sum = ClpT) of force-fed (**FF**) and control (**NFF**) Muscovy and Pekin ducks. Values are presented as lsmeans \pm standard errors.

| Breed | Muscovy | | Pekin | | RMSE ⁽¹⁾ | D ⁽²⁾ | B ⁽³⁾ | D*B ⁽⁴⁾ |
|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------------|------------------|------------------|--------------------|
| Diet | NFF | FF | NFF | FF | | | | |
| MMP-2 | 1.8 \pm 0.4 | 1.3 \pm 0.5 | 1.3 \pm 0.3 | 0.8 \pm 0.3 | 0.38 | *** | *** | NS |
| Cts1 | 2.9 \pm 1.7 | 3.5 \pm 3.6 | 2.7 \pm 1.8 | 4.2 \pm 3.4 | 2.75 | Ns | Ns | Ns |
| Cts2 | 2.1 \pm 1.2 | 2.8 \pm 2.1 | 2.8 \pm 1.1 | 3.2 \pm 2.1 | 1.71 | Ns | Ns | Ns |
| Cts3 | 2.0 \pm 0.6 | 2.8 \pm 1.0 | 2.5 \pm 0.8 | 1.3 \pm 0.5 | 0.74 | Ns | Ns | *** |
| Cts T | 6.9 \pm 2.5 | 9.1 \pm 5.4 | 8.0 \pm 2.9 | 8.6 \pm 4.4 | 3.95 | Ns | Ns | Ns |
| μ -calpain | 0.8 \pm 0.4 | 0.6 \pm 0.4 | 2.2 \pm 0.9 | 1.7 \pm 0.7 | 0.60 | Ns | *** | Ns |
| m-calpain | 1.7 \pm 0.6 | 0.5 \pm 0.3 | 1.5 \pm 0.3 | 1.0 \pm 0.4 | 0.41 | *** | Ns | * |
| Clp T | 2.5 \pm 0.8 | 1.1 \pm 0.6 | 3.7 \pm 1.2 | 2.7 \pm 1.0 | 0.91 | Ns | Ns | Ns |

*, ** and *** for $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$ and $P \leq 0.001$ respectively. Ns for $P > 0.05$.

⁽¹⁾RMSE = Root Mean Square Error. ⁽²⁾D = effect of diet (NFF vs. FF), ⁽³⁾B = effect of breed (Muscovy vs. Pekin), and ⁽⁴⁾D*B = effect of the interaction between the diet and the breed.

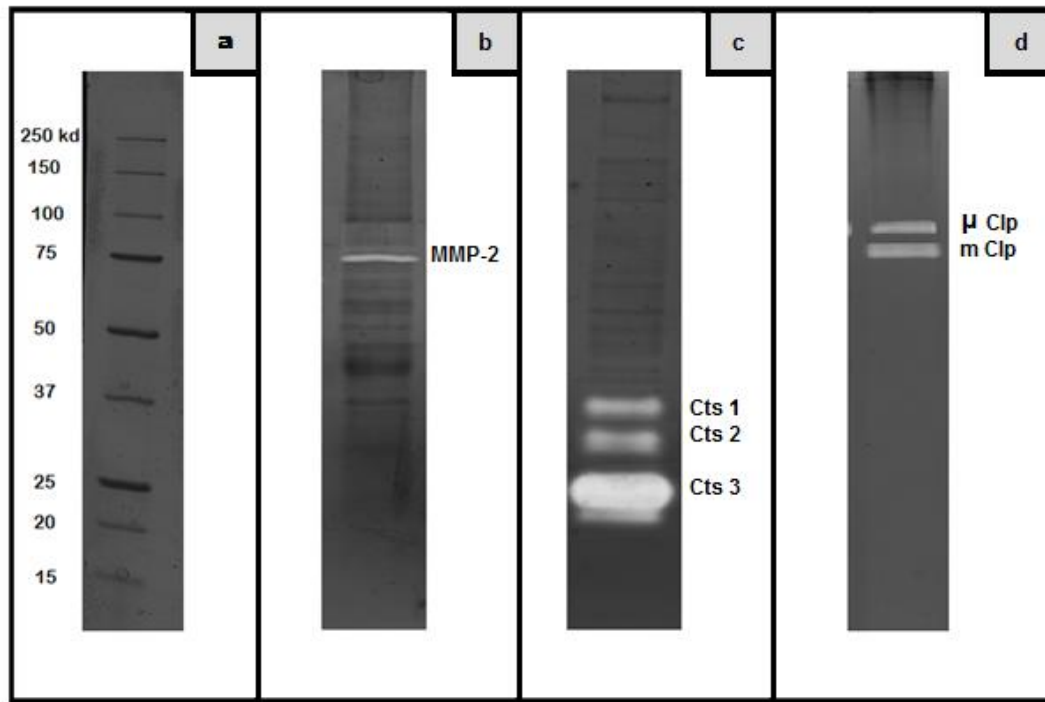


Figure 1. Molecular weight standards (a) and zymograms of the 72 kDa MMP-2 band (b), the 3 cathepsins bands (c) Cts1 (37 kDa), Cts2 (30 kDa) & Cts3 (25 kDa) and the μ - & m-calpains (μ clp & m clp) 80 kDa bands (d) analyzed by zymography in duck fatty liver samples.

Article 2

Effet des différentes vitesses de refroidissement sur les paramètres de qualité de foie gras

A soumettre dans Meat science

Le but de cet essai était d'étudier l'effet de la vitesse de refroidissement ainsi que celui du stockage *post mortem* sur les activités protéolytiques et en conséquence sur les qualités technologique et sensorielle du foie gras de canard.

Les foies de 72 canards éviscérés à chaud et dont le poids est compris entre 550-600g ont été aléatoirement attribués (n=24/groupe) à un des trois groupes : UF (ultra-rapide ; $v=0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$), F (rapide ; $v=0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$) et S (lent ; $v=0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Trois prélèvements ont été effectués à : T0=20 min (Matière sèche, azote totale, lipides totaux, zymographie et gel SDS-PAGE), T1= quand la température du foie atteint 10°C (donc à 50, 120 et 210 min post mortem pour UF, F et S respectivement) (Texture, fonte, zymographie et gel SDS-PAGE), et T2=24 h *post mortem* (fonte, zymographie et gel SDS-PAGE).

Nos résultats montrent que les foies appartenant au groupe UF avaient une texture moins dure, un rendement plus élevé, ainsi que des activités protéolytiques moins altérées avec le temps par rapport aux foies des deux autres groupes F et S. Ces résultats suggèrent que l'adoption d'un refroidissement rapide permet de ralentir les activités protéolytiques. En conséquence la dégradation des protéines, qui est à l'origine des altérations structurales et donc de la texture, est diminuée. Ceci, permet donc d'obtenir un rendement technologique plus élevé. Cependant l'effet des différentes méthodes de refroidissement sur la fonte ne sont pas significatifs qu'à partir du temps T2.

Effect of chilling rates on the quality parameters of mule duck “foie gras”

S. Awde^{b,a,c}, N. Marty-Gasset^{a,b,c}, G. Sandri^d, A. Dalle Zotte^d and

Hervé Rémignon^{b,a,c,*}

^a INRA, UMR1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d’Elevage, F-31326 Castanet-Tolosan, France

^b Université de Toulouse INPT ENSAT, UMR1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d’Elevage, F-31326 Castanet-Tolosan, France

^c Université de Toulouse INPT ENVT, UMR1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d’Elevage, F-31076 Toulouse, France

^d University of Padova, Agripolis, 35020 Legnaro, Padova, Italy

ABSTRACT

The aim of this experiment was to study the effect of chilling rates on the quality features of fatty livers. Three different chilling rates were applied, ultra-fast, fast and slow and results were compared at time T1 when the internal temperature of livers reached 10°C and at time T2=24 h post mortem. Samples from the UF group reached the T1 temperature at 50 min post mortem and had the least hard and cooking losses (25 ± 9 %). The F and S groups reached the T1 temperature after 120 and 210 min post mortem and presented highest melting (36 ± 9 and 41 ± 9 % respectively at time T2) and harder livers. In parallel, the proteomic analysis revealed less modified proteolytic activities in samples from the UF group, and associated less proteins degradations, than in samples from the F and the S groups. Effects of the different chilling rates were mainly significant at time T2 (24h post mortem).

KEYWORDS

Fatty liver, technological yield, zymography, calpain, MMP-2, cathepsin.

1. Introduction

From a sanitary point of view, animal products have to be chilled as soon as possible after slaughter. Adopting a suitable method and speed of chilling is very critical and can affect the technological and organoleptic qualities of the final product. It is well known that temperature plays an important role in the determination of the texture, which is considered to be the most important quality attribute of fish and meat (Ali et al., 2008; Erikson, Misimi, & Gallart-Jornet, 2011; Petäjä, Kukkonen, & Puolanne, 1985). *Post mortem*, the degradation of animal tissues proteins under the action of proteolytic enzymes contributes to this tenderization of flesh. While this phenomenon is appreciated in meat because it improves tenderness, it is undesirable in fish and leads to its softening (Cheret, Delbarreladrat, Lamballerieanton, & Verrezbagnis, 2007). As for other animal products, the texture of “foie gras” (fatty liver) is an important quality parameter. Based on its texture, three classes of fatty liver can be distinguished, i.e. soft, firm and hard fatty livers. In fact, the texture of a fatty liver is determined by its biochemical composition and mainly by its water and fat contents. The richer the fatty liver is in water the softer it is, and the richer in fat the harder it is. Softness is considered as a defect in fatty livers because it also induces the highest weight losses during chilling and/or storage because of its high water content. On the other hand, although hard fatty livers present the lowest weight losses during post-mortem processing, they are not desired by processors neither. In fact, the texture is strongly correlated to cooking yield, the major quality issue that faces the industry of fatty liver. Industrials have noticed that the harder the liver the more it melts during cooking (Théron, 2011). Melting consists of an exudation essentially of lipidic nature due to heating treatments (sterilization or pasteurization) and could be influenced by many factors such as the genetic type of force-fed palmipedes (Salichon, Guy, Rousselot, & Blum, 1994): geese vs. Mule, Pekin or Muscovy ducks, the weight of the fatty liver (Blum, Labie, & Raynaud, 1990) or its total

lipids content (Nir & Nitsan, 1976). Rearing factors such as the duration of force-feeding or the age of birds can also influence the melting of fatty livers during cooking. Finally, technological parameters such as cooking temperature or duration have also been shown to alter the cooking yield (Rousselot-Pailley, Guy, Sellier, & Blum, 1992). However, despite standard practices used by fatty livers processors to maintain the variability of fat loss at a lowest point, the inter-individual variability remains high. The coefficient of variation of cooking losses within a flock can exceed 50% under commercial conditions (Theron et al., 2011). Cooking losses are then of great importance for processors because it affects their output and thus their profitability. Moreover, cooking losses cause alterations in organoleptic properties and consequently degrade the image of the final product which is sought for its particular richness in fat. Firm fatty livers are preferred by processors because they represent a good compromise between high water and fat losses resulting from soft and hard fatty livers respectively. For this reason, the texture of fatty livers is manually estimated and livers are usually sorted into the 3 classes in order to reduce the melting rate variability. Nevertheless, this sorting alone is not sufficient and should be coupled with an adequate chilling method in order to obtain the highest technological yield. Surprisingly, unlike for fish and meat the chilling rate effect on the fatty liver has been poorly studied. In fish and meat, *post mortem* proteolytic activities are known to be involved in biochemical and structural changes during aging (Delbarre-Ladrat, Chéret, Taylor, & Verrez-Bagnis, 2006; Lametsch, Roepstorff, & Bendixen, 2002).

In this study, we investigate the effect of three different chilling rates (ultra-fast, fast, and slow) on proteolytic activities of three major types of proteases (calpains, cathepsins and MMP-2) to better understand if they could be associated with differences in the technological yield (or cooking losses) of fatty liver. We also measured the effects of storage for 24 hours on both proteolytic activities and the technological yield.

2. Material and methods

2.1. Animals.

The experiments described here fully comply with the legislation on research involving animal subjects according to the European Communities Council Directive of November, 24 1986 (86/609/EC). Investigators were certificated by the French governmental authority for carrying out these experiments (accreditation n°31-11 43 501). Livers used for this experiment were issued from commercial flocks of male Mule ducks (*Cairina moschata* x *Anas platyrhynchos*) reared until the age of 13 weeks according to standard practices. At this age, ducks were force-fed by the distribution of a soak-corn mixture (42% grain-58% flour) twice daily during a period of 12 days. Ducks were then slaughtered in a commercial plant.

2.2. Experimental methods

After slaughtering operations, fatty livers were eviscerated, weighed and because the liver weight is known to affect the final melting rate, only fatty livers weighing from 550 to 600 g were harvested (n=72 livers). Those livers were then randomly assigned to 3 experimental groups (24 each) and submitted to a particular chilling protocol. The slow chilling, or **S**, group consists of livers that were immediately placed in a refrigerator at 4° C. The fast chilling livers (**F** group) were placed in a negative air (- 3 °C) blowing cooling tunnel for 15min and subsequently placed at 4° C. Ultrafast chilling (**UF** group) were placed in the same tunnel during 3x15 min and subsequently placed et 4°C. Thermic sensors were randomly placed in two livers per treatment to record the temperature evolution.

2.3. Fatty liver processing and sampling

At the time of evisceration (T0 =20 min after slaughter), and before any chilling treatment, 10 g samples were harvested, frozen in liquid nitrogen and stored at -80° C. The

second sampling (**T1**) was carried out on half of the samples (n=12 samples /group) when the internal liver temperature reached 10° C in each respective group. The rest of the livers were kept at 4°C until **T2**=24 hours when the third sampling was performed (n=12 samples /group).

At times T1 and T2, 10 g of liver samples were collected for proteomic analysis, frozen in liquid nitrogen and preserved at -80°C until analysis. Additive samples of 60 g were taken from the middle part of the livers and placed into a glass can to be used for the melting test (times T1 and T2). Salt (13 g/kg) and pepper (2 g/kg) were just added to those samples and the glass cans were cooked in an autoclave at 90°C for 75 min. The cans were subsequently chilled using tap water and stored for two months at 4°C. After this storage period, livers were removed from glass cans and all visible exterior fat was trimmed by a gentle scrapping using a knife. The technological yield was then evaluated by the expression of fat losses during cooking and storage and expressed as a percentage of the initial weight:

$$\text{Technological yield (\%)} = (\text{fat trimmed liver weight} / \text{raw liver weight}) * 100.$$

$$\text{And thus, melting rate (\%)} = 100 - \text{Technological yield}.$$

At time T1, using a wire, two cores of 1.5 cm long were cut out from the middle part of each liver to be used for texture evaluation. Discs of a 2 cm diameter were taken from each core using a cylindrical shape cutter. The texture of discs was then evaluated after a bi-cycle compression test (Texture Profile Analysis) of a disc using a texturometer (compression speed 1mm/s; 60% deformation). The texture was measured by 5 parameters (hardness, cohesiveness, elasticity, gumminess and chewing) as described by (Meullenet, Lyon, Carpenter, & Lyon, 1998).

2.4. Biochemical analysis

All biochemical analyses were performed with grounded samples of liver and in duplicate to minimize technical variations. The dry matter content of fatty livers was determined by drying a mass of grounded liver in an oven at 105° C for 24 hours (Molee, Bouillier-Oudot, Auvergne, & Babilé, 2005).

Total lipids content of raw samples was determined according to Folch et al., (1957). After the extraction of lipids by a chloroform/methanol solution, quantification of total lipids content of each sample was performed gravimetrically after evaporation of the chloroformic phase. Total lipid content was expressed as a percentage of the dry matter.

The protein percentage was determined by the method of Dumas (AOAC, 1989). The technique implies a complete combustion at 850°C of the protein matrix. The gases and by-products of combustion were condensed at 6°C and total nitrogen is then detected and quantified. The crude proteins content is estimated by the formula:

$$\text{Crude proteins} = \text{Total nitrogen} \times 6.25$$

2.5. Proteomic analysis

2.5.1. Protein extraction

Livers were primarily crushed into powder in liquid nitrogen. Liver lysis was then achieved using Fastprep-24 (MP BioMedicals, Illkirch, France) for 20 seconds. Briefly, 1.5 ml of extraction buffer A (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0.05% Brij 35, 10 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF) and 1.2 ml of extraction buffer B (50 mM Tris-Base pH 8.3, 20 mM EDTA, 10 mM EGTA, 0.1% β-mercaptoethanol) were added respectively to 75 and 300 mg of liver tissue in order to extract gelatin (MMP-2 and cathepsins) and casein (calpains) degrading proteases respectively. Samples were then centrifuged at 12 000 g at 4°C for 15 min and the fat cake (extracted lipids) was removed. This operation was repeated twice to make sure to get a good separation of soluble proteins from lipids and other cell

components. Finally, supernatants were collected and stored at -80°C. Total protein concentration in extracts (supernatants) was determined using Bradford's method with BSA as protein standards. For each extraction buffers, the extractability i.e. the yield of extractable proteins by a given extraction buffer (xtgelt and xtcasp for gelatin and casein degrading proteases extraction buffers, respectively) was calculated from the total quantity of proteins found in the raw liver.

2.5.2. MMP-2 Gelatin Zymography

Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) gelatinolytic activity was detected according to (Kizaki et al., 2008). Briefly, samples containing 40 µg of proteins were mixed (1/4 vol/vol) with the sample buffer (150 mM Tris Base pH 6.8, 30% glycerol, 4% SDS, 40 µM ZnCl₂ and 0.1% Bromophenol Blue) and loaded onto a 12% polyacrylamide gels containing 0.2% gelatin A (1 mm spacers; 5 mL / mini-gel from Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Gels were then run under denaturing but non-reducing conditions (4°C, 125 V, 2h). Proteolytic activity was finally achieved through washing gels for 30 min in TBS-T buffer (20mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween) and 1h in the incubation buffer (50 mM Tris HCl pH 7.5, 6 µM ZnCl₂, 5 mM CaCl₂, 0.05% Brij, 0.02% NaN₃) with 2.5% Triton X-100. Following that, gels were incubated overnight (18 h) at 37°C in the same buffer but without Triton-X 100. Finally, zymograms were stained with a solution containing 0.1% Naphthol Blue Black for 2h, and then washed with a destaining solution (45% ethanol and 10% acetic acid). Digestion of the gelatin due to MMP-2 activity appeared as white bands on a dark blue background.

2.5.3. Cathepsins Gelatin Zymography

Cathepsins activities were detected according to (Afonso, Romagnano, & Babiarz, 1997). Briefly, samples containing 15 µg of extracted proteins were loaded on 12%

polyacrylamide gels containing 0.2% gelatin and run as previously described. Resulting gels were then washed twice for 30 min in a 0.1 M sodium acetate buffer solution (pH 5.2) containing 2.5% Triton X-100. Then, gels were incubated overnight with the incubation buffer (0.1 M sodium acetate + 2 mM DTT) at 37°C. Gels were then stained in a 0.5% Coomassie Brilliant Blue R-250 solution for 2h before washing in a destaining solution (45% ethanol and 10% acetic acid). Digestion of the gelatin due to cathepsins activities appeared as white bands on a blue background.

2.5.4. Calpains Casein Zymography

Using the method of (Raser, Posner, & Wang, 1995), calpain activities were detected on 10% polyacrylamide gels containing 0.2% casein and previously loaded with samples containing 40 µg of proteins diluted (Vol/Vol, 1/4) in the calpain sample buffer (150 mM Tris base, 20% glycerol, 0.05% Bromophenol Blue, 0.75% β-mercaptoethanol). Gels were run in a calpain running buffer (192 mM glycine, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 25 mM Tris base, pH 8.3) for 2 hours (4°C, 100 V). Then, gels were washed twice in a calpain activation solution (20 mM Tris base, pH 7.4, 10 mM CaCl₂) for 30 min and incubated (overnight at 37° C) in the same buffer containing 10 mM DTT. Finally, gels were stained and destained as previously described for cathepsins. Digestion of the casein due to calpains activity appeared as white bands on a blue background.

2.5.5. SDS-PAGE

Proteins were separated on 10% polyacrylamide gels. Samples diluted (Vol/Vol, 4/1) in the Laemmli's sample buffer (2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 10% glycerol and 62 mM Tris-HCl, pH6.8) were loaded with 60µg proteins per lane. SDS-PAGE gels were performed following the method described by (Laemmli, 1970) using Mini-Protean II electrophoresis

unit (125 V for 2h). After the run, gels were stained overnight in Coomassie Brilliant Blue G-250 (PageBlue Protein Staining Solution, FERMENTAS).

2.5.6. Image Analysis.

According to the procedure described by Bax(Bax et al., 2012), zymographic gels were scanned with an Image Scanner III using Image Master Platinum software (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Each liver sample was processed individually, and the value for main bands was calculated by using Image Master Platinum application. Each gel also included a pool of all samples run and was used as an internal standard. Protease activity was considered as the combination of computerized measurements of both intensity and volume of main bands for each sample. Then, relative protease activity was estimated as protease activity / pool activity within each gel.

According to the procedure described by (Marino et al., 2013) the identification of proteins molecular weight was done by comparison with a known molecular weight standard (precision plus protein standard-broad range, Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Bands were analyzed using Image Studio Lite 3.0 free online software (www.licor.com/islite) to determine the signal intensity (optical intensity) of the defined band. The relative quantity of each band was determined as signal intensity of the defined band / signal intensity of the pool.

2.5.7. Bands identification by mass spectrometry

Bands of interest were manually excised in our laboratory and analyzed by the spectrometry platform PEFM (Plate-Forme d'Exportation du Métabolisme, INRA de Theix). Proteins were extracted, Trypsin digested analyzed by nano-LC-MS/MS coupled to an LTQ-Orbitrap mass spectrometer according to the method described by Theron et al., (2011). MS/MS spectra were processed by Mascot software against the *Gallus gallus* (SwissProt-

TrEmbl) and *Caïrina moschata-Anas platyrhynchos* (NCBI) databases. Protein identification was validated when at least 3 peptides originating from one protein showed significant identification Mascot score ($p < .005$). Only proteins with a corresponding molecular weight and with at least 10 matching peptides were retained in this study.

2.6. Statistical analysis

For statistical analysis, the General Linear Model procedure of SAS (2011) software was used initially with a two-ways Anova to compare the effects of chilling rates and times post-mortem. When the interaction between chilling rates and times was not significant ($p > 0.05$), independent one-way Anovas were further performed. When appropriate, means were compared according to Student-Newman and Keuls' test. Correlation values were performed according to Pearson (Proc Corr, SAS 2011).

3. Results and discussion

The objective of this experiment was to study the effect of different initial chilling rates and short post mortem storage on the quality parameters of fatty liver. To ensure that any difference is not group related, we chose to compare livers at time $T_0 = 20$ min *post-mortem* before the application of any chilling treatment (Table 1). Because it is already known that the weight of fatty liver is one of the most important parameter affecting the melting rate, we chose to work with a very narrow range of weight (550-600g) to prevent any weight-linked variability. As a whole, livers had a 70.2% dry matter content of which 62% were lipids and 7% proteins. These values are very similar to those previously reported by (Salichon et al., 1994; Theron et al., 2012). However, while all biochemical parameters turned to have similar values for the three treatments at time T_0 , the percentage of lipids was found to be slightly higher (4 points) in the F group. Nevertheless, the dry matter content was similar in the three groups of samples and we conclude that the observed difference in total lipids content can only be technically-linked.

To ensure that the different adopted methods of chilling had a real impact on the chilling rate, a couple of thermic sensors were placed in two livers per treatment in order to monitor the temperature evolution during 6.5 hr. The second sampling (T1) was performed when the internal temperature of the liver reached 10°C. This temperature corresponds to the one used in processing plants because it facilitates the hand manipulation of fatty livers. Samples from the UF group were the firsts to reach this temperature at T1 =50 min while samples from the F and S groups reached it after 120 and 210 min *post mortem* respectively (Figure 1). This shows that livers submitted to negative air refrigeration (UF and F) witnessed a very fast initial temperature decrease (0.5°C/min). Nevertheless, when samples from the F group were transferred from the refrigeration air tunnel to a classical fridge (+ 4°C, time T1), the speed of temperature decreased and led to an overall chilling speed of 0.2°C/min. The chilling speed of livers kept from the start at + 4°C was the slowest with an average value of 0.1°C/min.

The study of the effect of different chilling rates on fatty liver quality parameters was realized through the evaluation of the five texture components (hardness, cohesiveness, elasticity, gumminess and chewiness) and by the measurement of the melting rate after cooking and storage. At time T1, livers from the F and S groups were harder, gummier and chewier than those from the UF group (Figure 2). Those differences in texture between the UF group from one side and the F and S groups on the other side were also reflected by a higher melting rate in these two groups compared to the first one only at time T2 (24h post mortem, Table 2). The significance of interaction between the effect of time and that of chilling rate indicates that samples are not similarly affected by the storage for several hours at +4°C. Moreover, our results showed that the melting rate is correlated ($R^2=0.4279$, $p<0.05$) to hardness and that this correlation is strengthened with slower chilling rates (figure 3). This result was not unexpected because (Cazeils, 2000) reported that hardness is

proportional to cooking losses. Our results clearly evidence that the fastest chilling rate (UF) gave the best quality livers in comparison to the slower ones (F and S) of which, both texture and melting rates were similar. This result was also reported by Goullieux and Chanut (2006) who indicated that the lowest cooking losses for fatty livers were obtained with the fastest adopted chilling method. Our results are also in good accordance with field practices in processing plants where a better technological yield (i.e. lower melting rate) is obtained when the evisceration of fatty liver is performed early after death. In fact, fatty liver processors have noticed that hot eviscerated livers (i.e. immediately after slaughter) rapidly chilled presented a higher quality than cold eviscerated ones (i.e. after cooling the entire carcass at +4°C) (Rousselot-Pailley, Guy, Gourichon, Sellier, & Blum, 1992). Our results, similar to those observed in the field, suggest that the mechanisms responsible for texture determinism in fatty livers are completely opposite to those reported for meat. In meat, the hardness is reputed to be proportional to the chilling speed (Olsson, Hertzman, & Tornberg, 1994; Van Moeseke, De Smet, Claeys, & Demeyer, 2001). Those differences are probably due to the composition and structural particularities of each type of tissue. For example, muscle is richer in proteins but poorer in lipids than fatty livers (proteins: 23% vs 7% and lipids 3% vs 60% for meat and fatty livers respectively) (Salichon et al., 1994; Williams, 2007). Consequently, the texture of raw meat is mostly determined by proteins i.e. soluble proteins, myofibrillar proteins, and collagen (Devine, Wahlgren, & Tornberg, 1999; Murphy & Marks, 2000; Reza Gheisari, Aminlari, & Shahram Shekarforoush, 2009) whereas in fatty liver it is more due to the lipidic fraction i.e. lipids content and cell membrane cholesterol/phospholipids ratio (Bouillier-Oudot, Cazeils, Babile, & Auvergne, 2000; Cazeils, 2000). In fact, Theron et al. (2011) demonstrated that cooking losses in fatty livers are caused by differences in tissue structure and lipid droplets morphology observed in high and low melting livers.

In order to further investigate the influence of different degrees of fatty liver proteolysis induced by different chilling rates, we chose to compare proteolytic activities of three families of proteases known to be involved in post mortem cellular reorganization (calpains, MMPs and cathepsins). Using one-dimensional zymography assays we detected calpain-1 and 2, MMP-2 and two unidentified cathepsins forms (cts1 and cts2) of 37 and 24 kDa (table 3). We also compared proteic profiles resulting from the extraction of main soluble proteins from fatty livers submitted to the three tested chilling rates at times T0, T1 and T2 post mortem. After a visual and a subjective comparison of the different gels, we selected and semi-quantified bands that seemed to be largely different from one time to another (molecular weights around 250, 180, 160 and 90 kDa) (Figure 4, table 4). The semi-quantification of both proteolytic activities (from zymograms) and proteins (from SDS-Page gels) did not reveal any differences due to chilling treatments for a given time post mortem. Ali et al. (2008), Redmond, McGeehin, Sheridan and Butler (2001) and Wiklund, Barnier, Smulders, Lundström, & Malmfors (1997) also reported no differences regarding proteolytic activities and/or proteins degradation between different chilling treatments in duck, lamb and reindeer bull muscles respectively. On the contrary, other studies reported a decrease in proteolytic activities associate with low temperatures of chilling (Devine et al., 1999; Hwang & Thompson, 2001; Steen, Claeys, Uytterhaegen, De Smet, & Demeyer, 1997). In our study, if different chilling rates did not have a direct impact on proteases activities or proteins semi-quantification, we noticed that the elapsed time post mortem had different effects for the different chilling rates. For example, while only activities of calpains were modified post mortem for the UF group, both calpains and MMPs activities were modified in samples from the F group. Samples from the S group exhibited the most tragic changes post mortem regarding proteolytic activities and protein bands intensities. Those results suggest that, as it is the case in muscle, the more rapidly the liver is chilled, the least

proteases are active and thus the least proteins are degraded post mortem. Concerning their post mortem evolutions, proteases activities were not changed similarly. This is due to the fact that each type of proteases has functional particularities. For example, calpains are cytoplasmic enzymes and can be activated immediately if proper conditions are available. Moreover, when active they auto-digest and this consequently causes a decrease in their activity post mortem (Cheret et al., 2007). In our study, the calpain 1 activity for all chilling treatments and the one from calpain 2 for the UF group decrease from time T1 to time T2. On the other hand, the calpain 2 activity starts decreasing at time T0 in all F and S groups. In their study, (Veiseth, Shackelford, Wheeler, & Koohmaraie, 2001) showed that the activity of the calpain-1 started dropping after 6 h post mortem and reached 60% of its initial value after 12h post mortem. The same study showed no decrease in the m-calpain (or calpain-2) activity all along the experiment (360 h post mortem) suggesting that this isoform of calpain is not implicated in post mortem tenderization. On the contrary, in the study made by (Delbarre-Ladrat et al., 2006), results showed a decrease of the calpain-2 activity in the sea bass white muscle during a 7 d *post mortem* storage. Meanwhile, cathepsins are lysosomal enzymes and thus need to be released from the lysosomes to be activated. This explains their delayed activation compared to calpains. This delay between calpains and cathepsins activity was also observed by Calkins & Seidman (1988). In this study, total cathepsins activity only increases between time T1 and T2 for samples from the S group. These results are in accordance with the results obtained in muscle by (Chéret, Hernández-Andrés, Delbarre-Ladrat, Lamballerie, & Verrez-Bagnis, 2005), concerning the activity of the cathepsin D. Finally, MMP-2, like other metalloproteinases, is synthesized in a latent (zymogen) form and when suitable conditions are available, it is converted to an active form (Balcerzak, Querengesser, Dixon, & Baracos, 2001). This might explain why in our study the MMP-2 increased between time T0 and T1. Sylvestre, Balcerzak, Feidt, Baracos and Bellut

(2002) demonstrated that MMP-2 activity remained stable from slaughter time until 21 d post mortem in lamb muscle.

Informations given by SDS-Page profiles are complementary from those issued from zymographies because they can reveal subsequent alterations of the different substrates of proteases (table 5). This is the case for the two main proteins identified in the 250 kDa band because fatty acid synthase and acetyl-CoA carboxylase were present in degraded forms presenting lower molecular weights. In the latest time T2, the appearance of a new band at 180 kDa, which contained fragments of higher molecular weight proteins, also confirmed proteolysis developments during the time of storage. The absence of myosin heavy chain fragments in the S group suggests that it might be more degraded and consequently moved to a lower point in the gel. The 190 kDa clathrin protein was found in the 160 kDa band. This result is not surprising, as this protein was reported to migrate as a 160 kDa band in several studies (Okamoto et al., 2000; Yamauchi et al., 2008). At time T2, and for the three treatments, we identified fragments from the fatty acid synthase enzyme among proteins weighing 160 kDa and this illustrates that this hyper abundant protein in fatty livers is easily degraded by proteases. At time T2 and for the lowest molecular weight, i.e 90 kDa, a lot of different proteins were identified mainly in samples from the S group. This also indicates that samples from the S group witnessed a higher degree of proteolysis than the two other groups because of a lower chilling rate. When looking at the nature of the proteins undergoing post mortem proteolysis in the liver, we noticed that most of them are functional proteins and only few were structural ones. The actin and myosin proteins are the mostly studied proteins as a sign of post mortem proteolysis and structural changes (Chéret et al., 2005; Reza Gheisari et al., 2009; Soltanizadeh, Kadivar, Keramat, & Fazilati, 2008). In our study we can also see that those two proteins are also rapidly hydrolyzed because they were present at a lower molecular weight than their expected theoretical molecular weight. This is mainly evident in samples

from the S group. However, in this study only targeted bands of SDS-Page gels were analyzed and it will be now interesting to further investigate protein degradation with a broader approach.

4. Conclusion

In this study we showed that adopting a conventionally slow chilling rate of fatty livers increases hardness and leads to a final higher degree of melting. We also demonstrated that this higher melting rate is associated with higher proteolytic activities mainly at 24h post mortem when proteases have been active for several hours. This post mortem proteolysis affected mainly functional proteins but also some structural ones. This enforces the idea that structural alterations are probably in the origin of higher melting rates. Finally, if the cooking of fatty livers has to be performed in the early time (0-3.5h) post mortem after the evisceration, the effect of different chilling rates on the melting rate seems to be negligible. On the other hand, if a short storage time is necessary before cooking, it will be interesting for processors of fatty livers to invest in an ultra-fast chilling method in order to minimize cooking losses.

5. Acknowledgments

Authors want to thank Isabelle Goulieux and Philippe Barret (CTCPA, Auch, France) for their help in measuring texture and cooking losses and the CIFOG (Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie Gras) for their financial help.

6. References

- Afonso, S., Romagnano, L., & Babiartz, B. (1997). The expression and function of cystatin C and cathepsin B and cathepsin L during mouse embryo implantation and placentation. *Development (Cambridge, England)*, 124(17), 3415–3425.
- Ali, M. S., Yang, H. S., Jeong, J. Y., Moon, S. H., Hwang, Y. H., Park, G. B., & Joo, S. T. (2008). Effect of Chilling Temperature of Carcass on Breast Meat Quality of Duck. *Poultry Science*, 87(9), 1860–1867. doi:10.3382/ps.2007-00194

- Balcerzak, D., Querengesser, L., Dixon, W. T., & Baracos, V. E. (2001). Coordinate expression of matrix-degrading proteinases and their activators and inhibitors in bovine skeletal muscle. *Journal of Animal Science*, 79(1), 94–107.
- Bax, M. L., Chambon, C., Marty-Gasset, N., Remignon, H., Fernandez, X., & Molette, C. (2012). Proteomic profile evolution during steatosis development in ducks. *Poultry Science*, 91(1), 112–120. doi:10.3382/ps.2011-01663
- Blum, J. C., Labie, C., & Raynaud, P. (1990). Influence du poids et de la composition chimique du foie gras d'oie sur la fonte mesurée après stérilisation à 104°C. *Sciences des aliments*, 10(3), 543–554.
- Bouillier-Oudot, M., Cazeils, J. L., Babile, R., & Auvergne, A. (2000). Relation entre la composition de la membrane plasmique des hépatocytes de foies gras d'oies et leurs caractéristiques technologiques et organoleptiques (pp. 139–142). Presented at the Research workshops on palmipeds bred for fatty livers. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=1010454>
- Cazeils, J.-L. (2000). *Caractérisation de la composition lipidique des membranes plasmiques des hépatocytes de foies d'oies : relation avec le rendement technologique des foies gras*. Toulouse, INPT. Retrieved from <http://www.theses.fr/2000INPT001A>
- Cheret, R., Delbarreladrat, C., Lamballerieanton, M., & Verrezbagnis, V. (2007). Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chemistry*, 101(4), 1474–1479. doi:10.1016/j.foodchem.2006.04.023
- Chéret, R., Hernández-Andrés, A., Delbarre-Ladrat, C., Lamballerie, M., & Verrez-Bagnis, V. (2005). Proteins and proteolytic activity changes during refrigerated storage in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) muscle after high-pressure treatment. *European Food Research and Technology*, 222(5-6), 527–535. doi:10.1007/s00217-005-0158-z
- Delbarre-Ladrat, C., Chéret, R., Taylor, R., & Verrez-Bagnis, V. (2006). Trends in Postmortem Aging in Fish: Understanding of Proteolysis and Disorganization of the Myofibrillar Structure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(5), 409–421. doi:10.1080/10408390591000929
- Devine, C. E., Wahlgren, N. M., & Tornberg, E. (1999). Effect of rigor temperature on muscle shortening and tenderisation of restrained and unrestrained beef m. longissimus thoracicus et lumborum. *Meat Science*, 51(1), 61–72.
- Erikson, U., Misimi, E., & Gallart-Jornet, L. (2011). Superchilling of rested Atlantic salmon: Different chilling strategies and effects on fish and fillet quality. *Food Chemistry*, 127(4), 1427–1437. doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.036
- Goullieux, I., & Chanut, I. (2006). Quantification de la dureté et de la couleur du foie gras cru : influence des techniques de refroidissement. Presented at the 7ème Journée de la recherche avicole et palimpèdes à foie gras.
- Hwang, I. H., & Thompson, J. M. (2001). The interaction between pH and temperature decline early postmortem on the calpain system and objective tenderness in electrically stimulated beef longissimus dorsi muscle. *Meat Science*, 58(2), 167–174.
- Kizaki, K., Ushizawa, K., Takahashi, T., Yamada, O., Todoroki, J., Sato, T., ... Hashizume, K. (2008). Gelatinase (MMP-2 and -9) expression profiles during gestation in the bovine endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 6(1), 66. doi:10.1186/1477-7827-6-66
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. doi:10.1038/227680a0

- Lametsch, R., Roepstorff, P., & Bendixen, E. (2002). Identification of protein degradation during post-mortem storage of pig meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(20), 5508–5512.
- Marino, R., Albenzio, M., della Malva, A., Santillo, A., Loizzo, P., & Sevi, A. (2013). Proteolytic pattern of myofibrillar protein and meat tenderness as affected by breed and aging time. *Meat Science*, 95(2), 281–287. doi:10.1016/j.meatsci.2013.04.009
- Meullenet, J.-F., Lyon, B. g., Carpenter, J. A., & Lyon, C. e. (1998). Relationship Between Sensory and Instrumental Texture Profile Attributes. *Journal of Sensory Studies*, 13(1), 77–93. doi:10.1111/j.1745-459X.1998.tb00076.x
- Molee, W., Bouillier-Oudot, M., Auvergne, A., & Babilé, R. (2005). Changes in lipid composition of hepatocyte plasma membrane induced by overfeeding in duck. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 141(4), 437–444. doi:10.1016/j.cbpc.2005.05.007
- Murphy, R. Y., & Marks, B. P. (2000). Effect of meat temperature on proteins, texture, and cook loss for ground chicken breast patties. *Poultry Science*, 79(1), 99–104. doi:10.1093/ps/79.1.99
- Nir, I., & Nitsan, Z. (1976). Goose fatty liver composition as related to the degree of steatosis, nutritional and technological treatments, and a simplified method for quality estimation. *Annales de Zootechnie*, 25(4), 461–470. doi:10.1051/animres:19760401
- Okamoto, C. T., Duman, J. G., Tyagarajan, K., McDonald, K. L., Jeng, Y. Y., McKinney, J., ... Forte, J. G. (2000). Clathrin in gastric acid secretory (parietal) cells: biochemical characterization and subcellular localization. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 279(3), C833–C851.
- Olsson, U., Hertzman, C., & Tornberg, E. (1994). The influence of low temperature, type of muscle and electrical stimulation on the course of rigor mortis, ageing and tenderness of beef muscles. *Meat Science*, 37(1), 115–131. doi:10.1016/0309-1740(94)90149-X
- Petäjä, E., Kukkonen, E., & Puolanne, E. (1985). Effect of post-mortem temperature on beef tenderness. *Meat Science*, 12(3), 145–154. doi:10.1016/0309-1740(85)90014-2
- Raser, K. J., Posner, A., & Wang, K. K. W. (1995). Casein Zymography: A Method to Study μ -Calpain, M-Calpain, and Their Inhibitory Agents. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 319(1), 211–216. doi:10.1006/abbi.1995.1284
- Redmond, G. A., McGeehin, B., Sheridan, J. J., & Butler, F. (2001). The effect of ultra-rapid chilling and subsequent ageing on the calpain/calpastatin system and myofibrillar degradation in lamb M. longissimus thoracis et lumborum. *Meat Science*, 59(3), 293–301.
- Reza Gheisari, H., Aminlari, M., & Shahram Shekarforoush, S. (2009). A comparative study of the biochemical and functional properties of camel and cattle meat during frozen storage. *Veterinarski Arhiv*, 79(1), 51–68.
- Rousselot-Pailley, D., Guy, G., GOURICHON, D., Sellier, N., & Blum, J.-C. (1992). Influence des conditions d'abattage et de réfrigération sur la qualité des foies gras d'oie. *INRA Production Animale*, 5, 167–172.
- Rousselot-Pailley, D., Guy, G., Sellier, N., & Blum, J. (1992). Influence des conditions d'abattage et de réfrigération sur la qualité des foies gras d'oie. *INRA production animale*, 5, 167–172.
- Salichon, M., Guy, G., Rousselot, D., & Blum, J. (1994). Composition of the 3 Types of Foie-Gras - Goose, Mule Duck and Muscovy Duck Foie-Gras. *Annales De Zootechnie*, 43(2), 213–220. doi:10.1051/animres:19940210

- Soltanizadeh, N., Kadivar, M., Keramat, J., & Fazilati, M. (2008). Comparison of fresh beef and camel meat proteolysis during cold storage. *Meat Science*, 80(3), 892–895. doi:10.1016/j.meatsci.2008.04.007
- Steen, D., Claeys, E., Uytterhaegen, L., De Smet, S., & Demeyer, D. (1997). Early post-mortem conditions and the calpain/calpastatin system in relation to tenderness of double-musled beef. *Meat Science*, 45(3), 307–319.
- Sylvestre, M. N., Balcerzak, D., Feidt, C., Baracos, V. E., & Bellut, J. B. (2002). Elevated rate of collagen solubilization and postmortem degradation in muscles of lambs with high growth rates: Possible relationship with activity of matrix metalloproteinases. *Journal of Animal Science*, 80(7), 1871–1878.
- Théron, L. (2011, November 21). *Déterminisme biologique de la variabilité de la fonte lipidique à la cuisson du foie gras de canard* (PhD Thesis). Retrieved from <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00001683/>
- Theron, L., Astruc, T., Bouillier-Oudot, M., Molette, C., Vénien, A., Peyrin, F., ... Fernandez, X. (2011). The fusion of lipid droplets is involved in fat loss during cooking of duck “foie gras.” *Meat Science*, 89(4), 377–383. doi:10.1016/j.meatsci.2011.04.018
- Theron, L., Cullere, M., Bouillier-Oudot, M., Manse, H., Dalle Zotte, A., Molette, C., ... Vitezica, Z. G. (2012). Modeling the relationships between quality and biochemical composition of fatty liver in mule ducks. *Journal of Animal Science*, 90(9), 3312–3317. doi:10.2527/jas.2011-4945
- Theron, L., Fernandez, X., Marty-Gasset, N., Pichereaux, C., Rossignol, M., Chambon, C., ... Molette, C. (2011). Identification by proteomic analysis of early post-mortem markers involved in the variability in fat loss during cooking of mule duck “foie gras.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23), 12617–12628. doi:10.1021/jf203058x
- Van Moeseke, W., De Smet, S., Claeys, E., & Demeyer, D. (2001). Very fast chilling of beef: effects on meat quality. *Meat Science*, 59(1), 31–37.
- Veiseth, E., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., & Koohmaraie, M. (2001). Effect of postmortem storage on mu-calpain and m-calpain in ovine skeletal muscle. *Journal of Animal Science*, 79(6), 1502–1508.
- Wiklund, E., Barnier, V. M., Smulders, F. J., Lundström, K., & Malmfors, G. (1997). Proteolysis and tenderisation in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus* L.) bull longissimus thoracis muscle of varying ultimate pH. *Meat Science*, 46(1), 33–43.
- Williams, P. (2007). Nutritional composition of red meat. *Nutrition & Dietetics*, 64, S113–S119. doi:10.1111/j.1747-0080.2007.00197.x
- Yamauchi, T., Ishida, T., Nomura, T., Shinagawa, T., Tanaka, Y., Yonemura, S., & Ishii, S. (2008). A B-Myb complex containing clathrin and filamin is required for mitotic spindle function. *The EMBO Journal*, 27(13), 1852–1862. doi:10.1038/emboj.2008.118

Table 1. Liver weight and biochemical parameters at time T0 in each chilling groups.

| Parameter | UF | | F | | S | | $P(c)^I$ |
|-------------------------|-------------------|-------|-------------------|-------|-------------------|-------|----------|
| Liver weight (g) | 574 | ± 11 | 574 | ± 8 | 574 | ± 9 | NS |
| Dry matter (%) | 69,7 | ± 3,4 | 70,3 | ± 4,4 | 70,5 | ± 4,0 | NS |
| Lipids (%) | 60,5 ^b | ± 4,4 | 64,3 ^a | ± 4,4 | 60,2 ^b | ± 2,9 | ** |
| Crude proteins (%) | 6,7 | ± 0,8 | 6,9 | ± 0,5 | 7,4 | ± 1,8 | NS |
| Extractability buffer A | 15,6 | ± 3,8 | 15,2 | ± 2,8 | 15,4 | ± 5,1 | NS |
| Extractability buffer B | 15,2 | ± 2,5 | 14,0 | ± 2,0 | 14,1 | ± 5,3 | NS |

^I $P(c)$: effect of chilling rate. ** for $P<0.01$, and NS=non-significant. Within a row, means assigned with different letters are significantly different, $P<0.05$

Table 2. Effect of chilling treatments (UF,F and S) on melting rates of fatty liver at times T1 and T2.

| Parameter | UF | | | | | | F | | | | | | S | | | | | | $P(c)^1$ | $P(t)^2$ | $P(t*c)^3$ |
|------------------|----|---|---|----|---|---|----|---|----|----|---|---|----|---|---|----|---|---|----------|----------|------------|
| Time | T1 | | | T2 | | | T1 | | | T2 | | | T1 | | | T2 | | | | | |
| Melting rate (%) | 22 | ± | 9 | 25 | ± | 9 | 25 | ± | 11 | 36 | ± | 9 | 24 | ± | 6 | 41 | ± | 9 | ** | *** | * |

¹ $P(c)$: effect of chilling rate. ² $P(t)$: effect of time. ³ $P(t*c)$: effect of the interaction between time and chilling rate. *, ** and *** for $P < 0.05$, 0.01 and 0.001 respectively.

Table 3. Effect of chilling treatments on proteases activities of fatty liver at times T0, T1 and T2.

| Protease | Time | UF | | F | | S | | $P(c)^1$ |
|------------------|----------|--------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|----------|
| MMP-2 | T0 | 1,07 | ± 0,2 | 1,1 ^y | ± 0,4 | 1 ^y | ± 0,2 | NS |
| | T1 | 1,14 | ± 0,2 | 1,4 ^x | ± 0,2 | 1,3 ^x | ± 0,3 | NS |
| | T2 | 1,25 | ± 0,3 | 1,1 ^y | ± 0,3 | 1,1 ^y | ± 0,2 | NS |
| | $P(t)^2$ | NS | | * | | ** | | |
| Cathepsin 1 | T0 | 1,1 | ± 0,3 | 1,1 | ± 0,3 | 1 ^y | ± 0,3 | NS |
| | T1 | 1,06 | ± 0,3 | 1,1 | ± 0,2 | 1 ^y | ± 0,2 | NS |
| | T2 | 1,1 | ± 0,3 | 1,2 | ± 0,5 | 1,4 ^x | ± 0,3 | NS |
| | $P(t)$ | NS | | NS | | ** | | |
| Cathepsin 2 | T0 | 1,22 | ± 0,5 | 1,3 | ± 0,4 | 1,2 ^y | ± 0,2 | NS |
| | T1 | 1,2 ^b | ± 0,3 | 1,6 ^a | ± 0,5 | 1,6 ^{x,a} | ± 0,4 | * |
| | T2 | 1,2 ^b | ± 0,2 | 1,6 ^a | ± 0,4 | 1,6 ^{x,a} | ± 0,5 | * |
| | $P(t)$ | NS | | NS | | ** | | |
| Total cathepsins | T0 | 2,33 | ± 0,6 | 2,4 | ± 0,6 | 2,3 ^y | ± 0,4 | NS |
| | T1 | 2,25 | ± 0,5 | 2,7 | ± 0,5 | 2,6 ^y | ± 0,5 | NS |
| | T2 | 2,3 ^b | ± 0,4 | 2,8 ^a | ± 0,4 | 3 ^{x,a} | ± 0,7 | ** |
| | $P(t)$ | NS | | NS | | *** | | |
| Calpain-1 | T0 | 1,5 ^x | ± 0,5 | 1,4 ^x | ± 0,4 | 1,4 ^x | ± 0,4 | NS |
| | T1 | 1,4 ^x | ± 0,5 | 1,3 ^x | ± 0,3 | 1,3 ^x | ± 0,4 | NS |
| | T2 | 0,9 ^{y,a} | ± 0,1 | 0,6 ^{y,b} | ± 0,3 | 0,6 ^{y,b} | ± 0,2 | * |
| | $P(t)$ | *** | | *** | | *** | | |
| Calpain-2 | T0 | 1,3 ^x | ± 0,4 | 1,3 ^x | ± 0,3 | 1,3 ^x | ± 0,3 | NS |
| | T1 | 1,4 ^x | ± 0,7 | 1 ^y | ± 0,3 | 1,1 ^y | ± 0,3 | NS |
| | T2 | 0,9 ^y | ± 0,3 | 0,9 ^y | ± 0,3 | 0,8 ^z | ± 0,2 | NS |
| | $P(t)$ | * | | *** | | *** | | |

¹ $P(c)$: effect of chilling rate. ² $P(t)$: effect of time. *, ** and *** for $P < 0.05$, 0.01 and 0.001 respectively. NS= non-significant. In a row, means assigned with different letters (a, b, c) are significantly different ($P < 0.05$). In a column, means assigned with different letters (x, y, z) are significantly different ($P < 0.05$).

Table 4. Effect of chilling treatments on SDS-PAGE profile of fatty liver at times T0, T1 and T2.

| MW band | temps | UF | | F | | S | | $P(c)^1$ |
|---------|----------|-------------------|--------|--------------------|--------|-------------------|--------|----------|
| 250 kDa | T0 | 0,87 ^x | ± 0,37 | 0,78 ^x | ± 0,24 | 0,86 ^x | ± 0,28 | NS |
| | T1 | 0,72 ^x | ± 0,32 | 0,71 ^x | ± 0,21 | 0,61 ^y | ± 0,19 | NS |
| | T2 | 0,30 ^y | ± 0,27 | 0,22 ^y | ± 0,14 | 0,31 ^z | ± 0,20 | NS |
| | $P(t)^2$ | *** | | *** | | *** | | |
| 180 kDa | T2 | 0,75 | ± 0,15 | 0,71 | ± 0,11 | 0,75 | ± 0,16 | NS |
| 160 kDa | T0 | 0,70 | ± 0,16 | 0,69 | ± 0,17 | 0,69 ^x | ± 0,16 | NS |
| | T1 | 0,66 | ± 0,25 | 0,67 | ± 0,13 | 0,56 ^y | ± 0,10 | NS |
| | T2 | 0,62 | ± 0,11 | 0,65 | ± 0,13 | 0,67 ^x | ± 0,11 | NS |
| | $P(t)$ | NS | | NS | | * | | |
| 90 kDa | T0 | 0,79 ^x | ± 0,13 | 0,78 ^x | ± 0,11 | 0,78 ^x | ± 0,09 | NS |
| | T1 | 0,69 ^y | ± 0,08 | 0,73 ^{xy} | ± 0,07 | 0,68 ^y | ± 0,07 | NS |
| | T2 | 0,71 ^y | ± 0,09 | 0,68 ^y | ± 0,08 | 0,67 ^y | ± 0,09 | NS |
| | $P(t)$ | * | | * | | *** | | |

¹ $P(c)$: effect of chilling rate. ² $P(t)$: effect of time. * and *** for $P < 0.05$ and 0.001 respectively. NS= non-significant. In a column, means assigned with different letters (x, y, z) are significantly different ($P < 0.05$).

Table 5. Identification of proteins, present (+) or lacking (-) in selected SDS-PAGE bands, by mass spectrometry at times T0 and T2.

| Band | Protein | Function | Hypothetical molecular weight | T0 | | | T2 | | |
|---------|-----------------------------------|--------------------------|-------------------------------|----|---|---|----|---|---|
| | | | | UF | F | S | UF | F | S |
| 250 kDa | Fatty acid synthase | Fatty acid synthesis | 275 | + | + | + | + | + | + |
| | Acetyl-CoA carboxylase | Fatty acid synthesis | 263 | + | + | + | + | + | + |
| 180 kDa | Fatty acid synthase | Fatty acid synthase | 275 | | | | + | + | + |
| | Acetyl-CoA carboxylase | Fatty acid synthesis | 263 | | | | - | + | + |
| | Myosin, heavy chain 9, non-muscle | Cell shape | 223 | | | | + | + | - |
| 160 kDa | clathrin heavy chain 1 | Structural | 190 | + | + | + | + | + | + |
| | Fatty acid synthase | Fatty acid synthesis | 275 | - | - | + | + | + | + |
| | Myosin, heavy chain 9, non-muscle | Cell shape | 223 | - | + | - | - | - | - |
| 90 kDa | Heat shock protein 90 kDa | Response to stress | 91 | + | + | + | + | + | + |
| | Valosin containing protein | Structural / Proteolytic | 90 | - | - | - | + | + | + |
| | Alpha-actinin-4 | Structural | 104 | - | - | - | - | + | + |
| | Phosphorylase | Carbohydrates metabolism | 90 | - | - | - | - | - | + |
| | tetrahydrofolate synthase | Catalytic activity | 100 | - | - | - | - | - | + |
| | ATP-citrate lyase | Catalytic activity | 119 | - | - | - | - | - | + |

Figures Caption

Figure 1. Fatty liver internal temperature evolution for the three different chilling methods: Ultra-Fast (UF), Fast (F) and Slow(S) during *post mortem* storage

Figure 2. Comparison of texture components between UF (ultra-fast), F (fast) and S (slow) chilling rates at time T1.

Figure 3. Correlation between melting rate and hardness in the UF, F and S groups at time T1 ($p < 0.05$)

Figure 4. SDS-PAGE gel showing the obtained proteic profiles for the three different chilling rates (UF, F and S) at times T0, T1 and T2

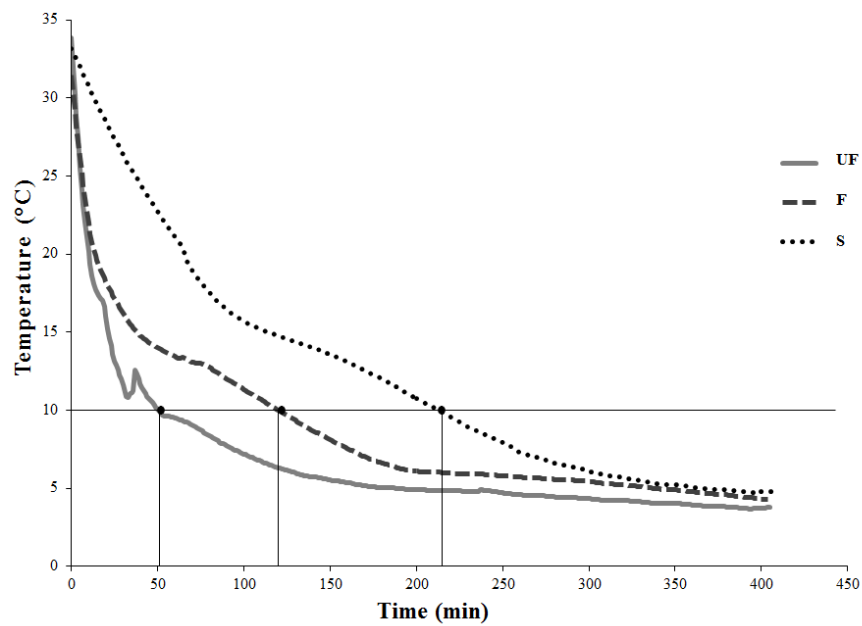


Figure 1. Fatty liver internal temperature evolution for the three different chilling methods:
Ultra-Fast (UF), Fast (F) and Slow(S) during initial *post mortem* storage

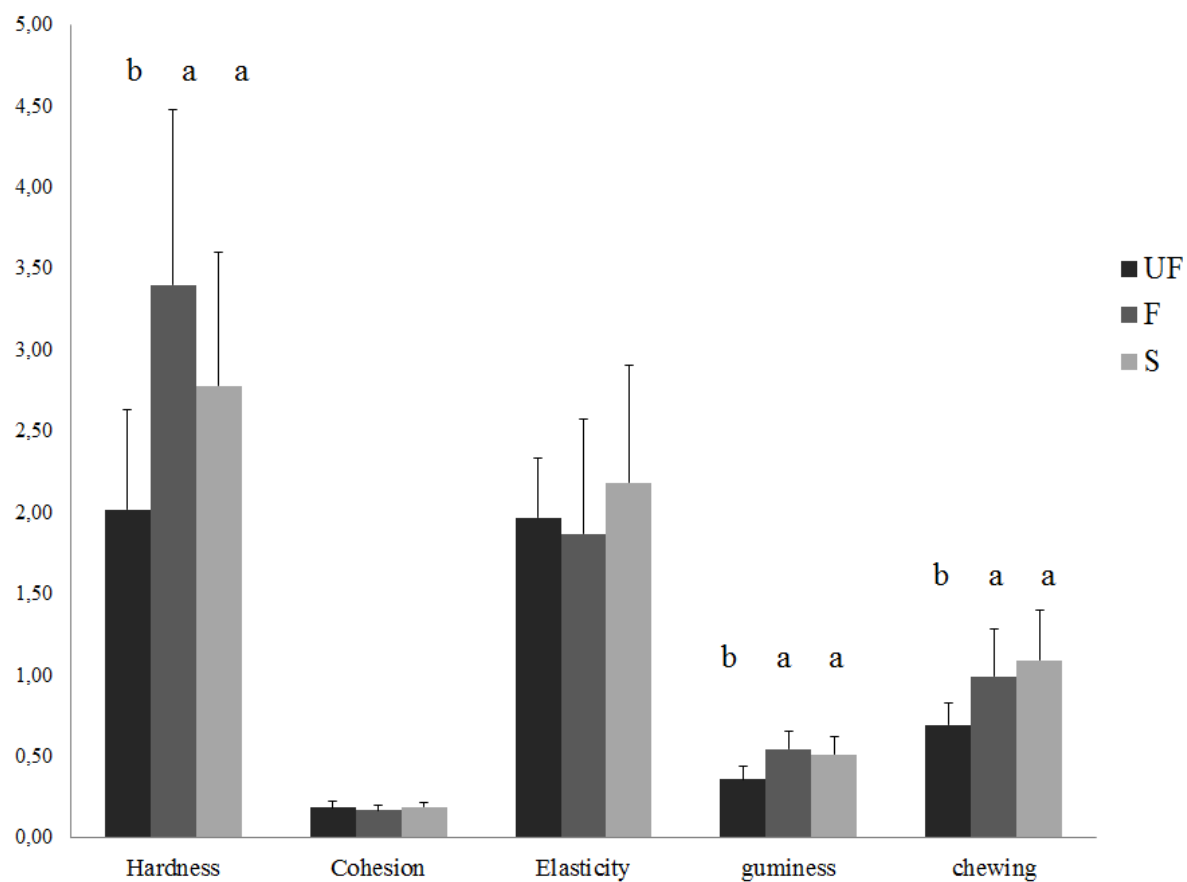


Figure 2. Comparison of texture components of fatty livers submitted to UF (ultra-fast), F (fast) and S (slow) chilling rates at time T1.

Treatments assigned with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

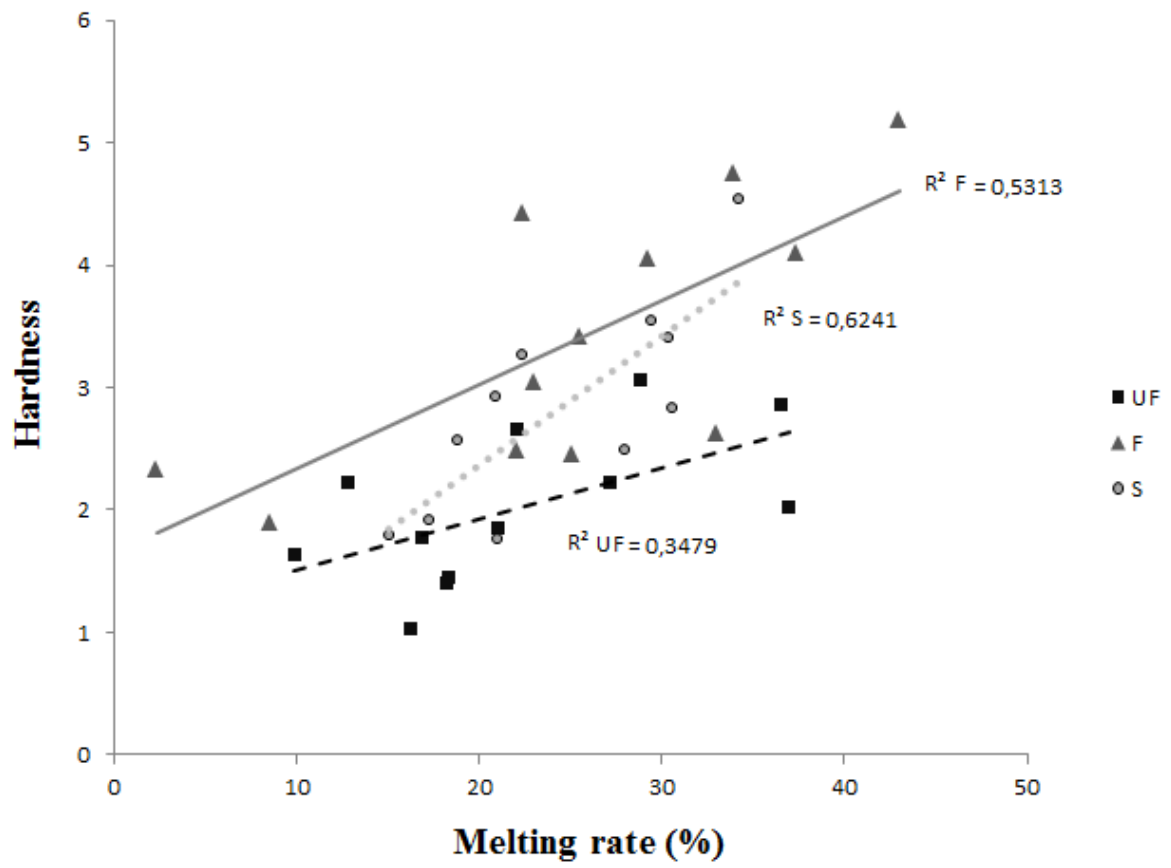


Figure 3. Correlation between melting rate and hardness in the UF, F and S groups at time T1 ($p < 0.05$).

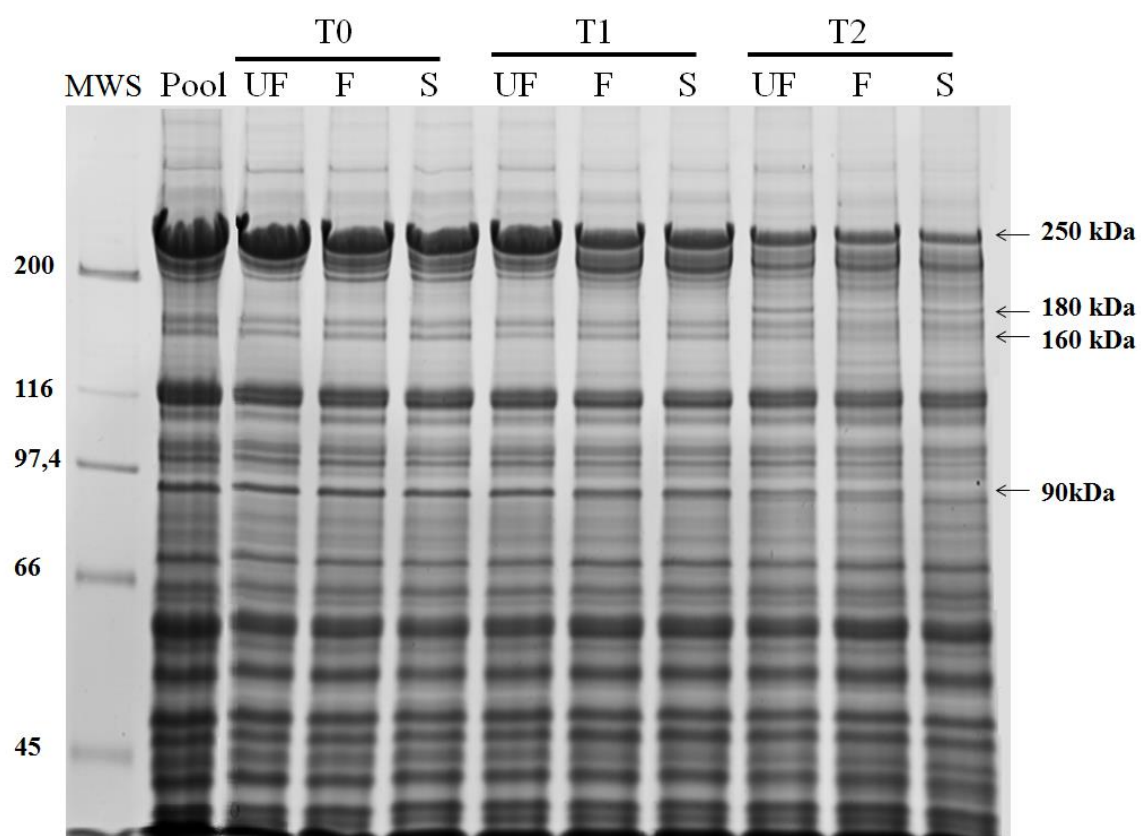


Figure 4. SDS-PAGE gel showing the obtained proteic profiles for the three different chilling rates (UF, F and S) at times T0, T1 and T2. Arrows indicate further analysed bands.

Article 3

Relation entre Activités protéolytiques et la variabilité de la fonte à la cuisson dans le foie gras de canard Mulard

Soumis dans Journal of agriculture and food science

L'objectif de cet essai est de comparer les activités protéolytiques chez les foies à fonte faible et les foies à fonte élevée chez les canards mulards.

En premier temps, un micro-test de fonte a été effectué sur 100 foies gras de canards mulards. Ce test qualitatif et objectif a permis de trier les foies selon leur taux de fonte. 40 foies à taux de fonte extrême ont été retenus : 20 foies à fonte faible et 20 foies à fonte élevée. Sur ces 40 foies, un deuxième test de fonte a été réalisé afin de quantifier le taux de fonte. Le taux de lipides, de matière sèche ainsi que les activités protéolytiques ont été mesurés chez les deux groupes de foies.

Nos résultats ont montré que les foies à fonte élevée avaient des taux de matière sèche et de lipides plus élevés. On a également montré que ces foies présentaient des activités protéolytiques plus élevées par rapport aux foies à fonte faible. Ces résultats suggèrent que les protéases peuvent contribuer au déterminisme de la fonte lipidique à la cuisson en induisant une fragilisation cellulaire plus ou moins importante

Relationship Between Proteolytic Activities and Cooking Loss Variability in Liver Issued from Force-Fed Mule Ducks.

Sahar Awde,^{†,*‡} Nathalie Marty-Gasset,^{*,†,‡} Kriengkrai Prahkarnkao,[§] and Hervé Rémignon^{†,*‡,#}

* INRA, UMR1388 GENEPHYSE, F-31326 Castanet-Tolosan, France

[†] Université de Toulouse INP-ENSAT, UMR1388 GENEPHYSE, F-31326 Castanet-Tolosan, France

[‡] Université de Toulouse INP-ENVT, UMR1388 GENEPHYSE, F-31076 Toulouse, France

[§] Department of Clinical Sciences and Public Health, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Salaya, Nakhon Pathom, 73140, Thailand.

Running title : Fatty liver cooking loss variability.

ABSTRACT: We investigated liver proteases activities to better understand mechanisms responsible for losses during the cooking of Mule ducks' fatty livers. Fatty livers of similar weights (520 g) were randomly selected among a large flock of overfed male Mule ducks and divided into two groups based on their cooking loss rate, L+ (high cooking losses, 36%) and L- (low cooking losses, 21%) respectively. In addition to dry matter and total lipids contents, main hepatic proteases (MMP-2, cathepsins and calpains) activities were measured by zymography. Results show that L+ samples presented higher total relative proteolytic activities (6.15 ± 1.07 vs 4.46 ± 0.52 for L+ and L- samples respectively) and total lipid content ($61\% \pm 3.03$ vs $53.68\% \pm 3.22$ for L+ and L- samples respectively) than L- ones. The results imply that proteases could be involved in the fragilization of hepatocytes structure resulting thus in higher cooking losses in L+ samples.

KEYWORDS: Fatty liver, cooking losses, proteolytic activities, zymography.

INTRODUCTION

Every year, approximately 27 000 tons of fatty livers are worldly produced. France is the first world producer with about three quarters of the total fatty liver production. Those fatty livers, also called “foie gras” by gastronomes, are issued from the force-feeding of waterfowl, mainly Mule ducks (*Caïrina moschata* x *Anas platyrhynchos*). Foie gras is often commercialized and consumed cooked through sterilization or pasteurization. The cooking procedure of raw fatty liver results in lipids and water release from hepatic tissue due to its thermal denaturation. The extent of cooking losses is of great importance to processors because it affects their output and thus their profitability. Moreover, cooking losses cause alterations in the organoleptic and sensorial properties, degrading thus the image of the final product which is sought for its particular richness in fat. It is well known that several factors can influence the degree of cooking loss in fatty liver, i.e. the genetic type of force-fed palmipedes¹ (geese vs. Mule, Pekin or Muscovy ducks), fatty liver's weight² and its total lipids content³ as well as rearing factors such as the duration of force-feeding or the age of birds. Technological parameters such as cooking temperature and duration have been also shown to alter cooking losses values⁴. However, despite all the set of measures taken to control its variability, the cooking loss of fatty livers remains the major quality issue that faces commercial plants of fatty liver. Despite the standard practices used under industrial production to reduce cooking loss variability, the inter-individual variability remains high⁵.

While the majority of studies focused on the lipidic fraction of the fatty liver and the structure of hepatocytes plasma membranes⁶, very few considered the proteic one to be involved in cooking loss percentage⁷. At the end of the force-feeding period, the absolute crude protein content is significantly increased in fatty livers compared to control ones, however crude proteins represent a lower percentage of the dry matter content⁸ (19.5 ± 0.23 vs. 7.5 ± 0.42 in fatty and control livers,

respectively). Recent studies have also demonstrated that some modifications in proteins metabolism are coupled with steatosis development^{9,10}. A proteomic analysis¹¹ on the variability of cooking loss in mule duck's fatty liver showed that the proteic metabolism of low melting fatty livers tend a for higher anabolism and protein synthesis while high melting fatty livers developed more cell protection mechanisms.

Based on what it is already known concerning cellular structure alterations due to proteases activities during post-mortem storage of meat^{12,13}, we hypothesized a possible similar role in the determinism of the value of cooking loss of Mule duck fatty liver. In this study, we compare main hepatic proteases activities in two groups of fatty livers largely differing in their cooking losses (CL) values. Similarly to what was already described in muscle structure alterations¹³, we hypothesized that active proteases (MMPs, calpains, cathepsins) participate more or less to post mortem hepatocytes degradation and therefore contribute to cellular weakening and consequently to high or low levels of cooking losses. This hypothesize was tested thanks to a principal component analysis. We aimed to find a consistent relationship between CL and biochemical parameters of fatty livers in order to identify the potential ones involved in cooking losses variability.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals. Acylamide, BisAcrylamide, Coomassie Brilliant Blue and materials for mini gels were purchased from Bio-Rad (Marnes la Coquette, France). Fastprep-24 was purchased from MP BioMedicals (Illkirch, France). All other chemicals were supplied from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

Animals. Fatty livers used in this experiment were issued from commercial flocks of male mule ducks (*Cairina moschata* x *Anas platyrhynchos*) reared until the age of 14 weeks according to standard practices. Birds were then force-fed by the distribution of a soak-corn mixture (25% grain, 35% flour

and 40% water, 3330 Kcal/kg, 8.28% crude proteins and 3.38% lipids) twice daily during 12 days. The experiments described here fully comply with legislation on research involving animal subjects according to the European Communities Council Directive of November, 24 1986 (86/609/EC). Investigators were certificated by the French governmental authority for carrying out these experiments (accreditation n°31-11 43 501).

Slaughter, Fatty Liver selection and Sampling. At the end of the force-feeding period, the slaughtering procedure was conventionally conducted in a commercial plant. 20 min after bleeding, livers were removed from carcasses and weighed to select the ones with a weight ranging from 500 to 550 g (n=100) and placed at +4°C for 6h. Selected livers were further sorted according to their cooking loss rate based on the Melting Micro-Test Method results (MMTM). Briefly, few grams (10 g) of liver were placed in metallic spoon-like cups before heating in an oven at +80°C for 15 minutes. Immediately after, a trained operator sorted low and high melting samples by visually estimating the quantity of fat released during heating. Based on the result, the MMTM allowed distinguishing two extreme groups, i.e. L+ (high melting rate or high CL) and L- (low melting rate or low CL) of twenty livers each.

Following this subjective classification, samples of 100g were taken from the middle part of the big lobe of the 40 selected livers to be further controlled with a quantitative cooking yield test. Samples of 10 g were also taken from the upper part of the big lobe, to be assigned for biochemical and proteomic analysis, and immediately frozen in liquid nitrogen before storage at -80°C until analysis.

Fatty liver cooking losses measurement. 100 g of liver were placed in a perforated plastic pot to drain exudates. The weight of each pot containing the samples was recorded in order to know the exact amount of raw liver placed in each perforated pot (W_{raw}). This set (liver + perforated pot) was then placed in a second pot and kept in a water bath (85°C) for one hour (water bath cooking). Finally, samples were removed from the 2 pots, drained, gently wiped and reweighed to determine the weight of the sample after cooking (W_{cooked}).

Cooking losses percentage (CL%) was then calculated according to the following formula: $CL = 100 - (W_{\text{cooked}} / W_{\text{raw}}) \times 100$.

Fatty liver biochemical analysis. All biochemical analyses were performed with grounded samples of liver and in duplicate to minimize technical variations.

Dry Matter: The dry matter content of fatty livers was determined by drying a mass of grounded liver ($W_{\text{dm}_{\text{raw}}}$) in an oven at 105° C for 24 hours⁸. Sand was added to previously weighed cups ($W_{\text{dm}_{\text{cup}}}$) to increase the surface of exchanges. Just after drying in the oven, samples were placed in desiccators to be cooled to room temperature before weighing ($W_{\text{dm}_{\text{dry}}}$). The percentage of dry matter (DM) was then determined by the formula:
 $DM = ((W_{\text{dm}_{\text{dry}}} - W_{\text{dm}_{\text{cup}}}) / W_{\text{dm}_{\text{raw}}}) * 100$.

Lipid content: Total lipids content of raw samples was determined according to the Folch's method¹⁴. After the extraction of lipids by a chloroform/methanol solution, quantification of total lipids content of each sample was performed gravimetrically after evaporation of the chloroformic phase. Total lipid content was expressed as a percentage of dry matter for each sample.

Protein extraction: Livers were primarily crushed into powder in liquid nitrogen. Liver lysis was then achieved using Fastprep-24 for 20 seconds. Briefly¹⁵, 1.5 ml of gelatin degrading proteases extraction buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0.05% Brij 35, 10 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF) and 1.2 ml of casein degrading proteases extraction buffer (50 mM Tris-Base pH 8.3, 20 mM EDTA, 10 mM EGTA, 0.1% β-mercaptoethanol) were added respectively to 75 and 300 mg of liver tissue in order to extract gelatin and casein degrading proteases respectively. Samples were then centrifuged at 12 000 g at 4°C for 15 min and the fat cake (extracted lipids) was removed. This operation was repeated twice to guarantee good separation of soluble proteins from lipids and other cell components. Finally, supernatants were collected and stored at -80°C. Total proteins' concentration in extracts (supernatants) was determined using Bradford's method with BSA as protein standards. For each extraction buffers, extractabilities (xtgelt and xtcalsp for gelatin and casein

degrading proteases extraction buffer respectively) were calculated by assuming a total protein content of 7 % DM as reported by in a previous study⁵.

MMP-2 Gelatin Zymography: Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) gelatinolytic activity was detected according to Kizaki¹⁵. Briefly, samples containing 40 µg of proteins were mixed (1/4 vol/vol) with the sample buffer (150 mM Tris Base pH 6.8, 30% glycerol, 4% SDS, 40 µM ZnCl₂ and 0.1% Bromophenol Blue) and loaded onto a 12% polyacrylamide gels containing 0.2% gelatin A (1 mm spacers; 5 mL / mini-gel). Gels were then run under denaturing but non-reducing conditions (4°C, 125 V, 2h). Proteolytic activity was finally achieved through washing gels for 30 min in TBS-T buffer (20mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween) and 1h in the incubation buffer (50 mM Tris HCl pH 7.5, 6 µM ZnCl₂, 5 mM CaCl₂, 0.05% Brij, 0.02% NaN₃) with 2.5% Triton X-100. Following that, gels were incubated overnight (18 h) at 37°C in the same buffer but without Triton-X 100. Finally, zymograms were stained with a solution containing 0.1% Naphthol Blue Black for 2h, and then washed with a destaining solution (45% ethanol and 10% acetic acid). Digestion of the gelatin due to MMP-2 activity appeared as white bands on a dark blue background.

Cathepsins Gelatin Zymography: Cathepsins activities were detected according to Afonso¹⁶. Briefly, samples containing 15 µg of extracted proteins were loaded on 0.2% gelatin gels containing SDS (12%) and run as previously described. Resulting gels were then washed twice for 30 min in a 0.1 M sodium acetate buffer solution (pH 5.2) containing 2.5% Triton X-100. Then, gels were incubated overnight with the incubation buffer (0.1 M sodium acetate + 2 mM DTT) at 37°C. Gels were then stained in a 0.5% Coomassie Brilliant Blue R-250 solution for 2h before washing in a destaining solution (45% ethanol and 10% acetic acid). Digestion of the gelatin due to cathepsins activities appeared as white bands on a blue background.

Calpains Casein Zymography: Using the method of Raser¹⁷, calpain activities were detected on 10% polyacrylamide gels containing 0.2% casein and previously loaded with samples containing 40 µg of proteins diluted (Vol/Vol, 1/4) in the calpains samples buffer (150 mM Tris base, 20% glycerol, 0.05% Bromophenol Blue, 0.75% β-mercaptoethanol). Gels were run in a calpain running buffer (192 mM glycine, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 25 mM Tris base, pH 8.3) for 2

hours (4°C, 100 V). Then, gels were washed twice in a calpain activation solution (20 mM Tris base, pH 7.4, 10 mM CaCl₂) for 30 min and incubated (overnight, 37° C) in the same buffer containing 10 mM DTT. Finally, gels were stained and destained as previously described for cathepsins. Digestion of the casein due to calpains activity appeared as white bands on a blue background.

Image Analysis. According to the procedure described by Bax⁹, gels were scanned with an Image Scanner III using Image Master Platinum software (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Each liver sample was processed individually, and the value of main bands was calculated by using Image Master Platinum application. Each gel also included a pool of all the samples run and was used as an internal standard. Protease activity was considered as the combination of computerized measurements of both intensity and volume of main bands for each sample. Then, relative protease activity was estimated as protease activity / pool activity within each gel.

Statistical analysis. For statistical analysis, the General Linear Model procedure of SAS software was used with a one-way ANOVA to compare L- and L+ samples. Correlations between variables were computed according to Pearson's method¹⁸.

In addition, a Principal Component Analysis (PCA) was performed with all samples and the biochemical and proteomic measured variables. This statistical method calculates new variables, called principal components, which are linear combinations of the original variables to account for the variability in the data based on the study of the covariances and the correlations between original variables¹⁹. Results are presented in a 2D projection graph where proximate variables at the periphery of the circle are positively correlated, while those separated by 180° are negatively correlated. The closer the variables are to the periphery of the circle, the higher the coefficient of correlation between variables. Individuals are also presented in the same 2D projection. When liver samples are located in the same part of the projection with a given variable, values of these samples for the considered variable are high. The PCA was performed with the Princomp procedure of SAS software¹⁸.

RESULTS and DISCUSSION

As reported in the **Table 1**, mean liver weight was very similar (520 g) in both L+ and L- ducks. This value is very similar to the one reported by Fernandez²⁰ for this typical program of force-feeding. From previous studies^{2,21}, it is well known that the greater the liver weight, the higher the cooking loss. On the contrary, in the present study, thanks to the original sorting, the weight of fatty livers cannot explain cooking loss differences as illustrated by the very low coefficient of correlation between liver weight and cooking loss ($r = 0.16$, $p > 0.05$). The percentage of cooking loss (CL %) was 1.72 fold higher ($p < 0.001$) in L+ than in L- samples. This indicates that the subjective MMTM is relevant in distinguishing low from high melting livers. Livers from the L+ group presented higher dry matter and total lipids contents than those from the L- group ($p < 0.001$). As reported in previous studies^{3,11,21}, the higher the lipid content, the higher the cooking losses ($r = 0.76$, $p < 0.001$). The buffer used for gelatin degrading proteases extraction allowed collecting similar amounts of proteins in both groups. On the contrary, the buffer used for casein degrading proteases extraction allowed to collect more proteins ($p < 0.05$) from L- than from L+ samples.

The MMP gelatin protease assay permitted the detection of a 72 kDa proteolytic band corresponding to the MMP-2 (**Figure 1b**). The protocol described by Kizaki¹⁵ allow to detect MMP-2 and MMP-9 (respectively gelatinases A and B) but in the present experiment only one isoform corresponding to MMP-2 was detected, probably because it is the most abundant MMP in the cellular extract. This gelatinolytic activity was inhibited in the presence of EDTA, DTT and in the absence of Ca^{2+} ions (data not shown). As reported in a previous study²² on cathepsins activity in Pekin and Muscovy ducks' livers, three proteolytic bands were detected for the cathepsin proteolytic assay. The upper band being considerably smaller in Mule ducks, we chose to focus on the two others ones presenting molecular weights of ~30 kDa and ~25 kDa respectively (**Figure 1c**). Unlike MMP-2 protease, those activities of cathepsin isoforms were not affected by the addition of DTT nor EDTA, but were inhibited in the presence of PMSF (data not shown). Unfortunately, no specific antibodies

directed against cathepsin isoforms from ducks are commercially available to help a better identification of the detected isoforms in the present study. Moreover, an identification test of those cathepsins using mass spectrometry analysis failed to reveal reliable results. In consequence, we chose to let unknown the precise identification of the two detected cathepsin isoforms in the present study and reported a total activity of cathepsins (CtsT, **Figure 2**) calculated as the sum of the individually detected activities. Calpains proteolytic assays revealed two bands which were active in the presence of 4mM of Ca^{2+} for the upper one and of 10 mM of Ca^{2+} for the lower one (**Figure 1d**). These results indicate that the two bands correspond to the μ - and m-calpains isoforms respectively. The m-calpain is also electrophoretically distinguishable from the μ -calpain because of its higher mobility in the gel²³. To further confirm the identification of these two caseinolytic proteases, effects of calpains inhibitors (leupeptin and E-64 both purchased from Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) were assessed before electrophoresis. As expected, the presence of these calpains inhibitors completely blocked the activity of those both neutral cysteine proteases (data not shown).

Results concerning extracted proteases relative activities were reported in the **Figure 2**. In both L+ and L- samples, zymograms profiles were similar but clearly exhibited higher values in L+ than in L- samples excepted for the relative activity of Ct-1. Values of proteases relative activities reported in the present experiment for L- samples were close to those reported for Pekin and Muscovy force-fed ducks by Awde et al.²². Finally, total extracted proteases activities appeared to be 1.37 fold ($p < 0.001$) higher in L+ than in L- fatty livers. Due to the fact that proteases remain active during post mortem storage, we think that these higher proteolytic activities have led to a higher degradation of cellular. Therefore, at the time of cooking, the overall fragility of L+ hepatocytes structure might have been higher and consequently more internal fluids were released from liver cells and finally lead to higher cooking losses values. This hypothesis was previously reported by Theron^{5,11}. Nevertheless, it has been reported that the post-mortem cooling rate largely influences the extent of cooking losses in fatty livers⁴. For example, fatty liver evisceration immediately after slaughter, associated with a rapid cooling, decreases cooking losses. On the contrary, when livers are kept inside the carcass during post-mortem cooling, the final cooking losses are increased. Besides, proteases activities are known, as for

other enzymes, to decreased at low temperatures²⁴. In consequence, we can hypothesize that the rate of cooling of livers post-mortem could influence the cooking losses by modulating, more or less, the total activities of proteases: the more proteases are active (under the influence of temperature for example) during post mortem time, the more the structure of hepatocytes might be altered and the more their lipid content will be exudated during cooking. In the present study, the cooling rate was the same for both L+ and L- livers (same process, same liver weights) but proteases activities were originally higher in L+ than in L- samples (**Figure 2**). Consequently, more cellular degradations occurred in L+ livers and might lead to more important cellular content releases during cooking. Nevertheless, this assumption need to be further verified by performing SDS-PAGE electrophoresis with proteins extracted from fatty livers at different times post-mortem. Finally, it seems that, for a given weight, livers could differ according to the level of their metabolisms at the time of slaughtering and this will influence the final quality of the product after cooking. When hepatic metabolisms are very active (high level of lipids accumulation, high proteolytic activities), livers tend to be more weakened leading to higher cooking losses values^{3,21}. Differences in levels of activity of hepatic proteases can have different origins such as the structure of the enzyme by itself (different isoforms), different concentrations of cellular activators (calcium content) or inhibitors (calpastatine, cystatine or tissue inhibitors of metalloproteinases). Those hypotheses will have to be further investigated by comparing hepatocytes contents between L- and L+ samples.

The relationships between biochemical content, proteases activities and cooking losses are well illustrated by the principal component analysis (**Figure 3**) that clearly associates lipid and dry matter contents with proteases activities and cooking losses along the first principal component. It also illustrates the strong correlation between DM and lipid content ($r=0.88$, $p<0.001$) and their strong opposition with extractabilities (xtcalp and xtgelt) of soluble proteins. The new linear combination of original variables given by the PCA allows a good distinction L+ and L- samples (**Figure 4**). Indeed, without using the CL% variable, 85% of the examined samples were correctly grouped according to their CL determinism. By combining results of the **Figure 3** and the **Figure 4**, it appears that L+ samples are mainly positively associated with lipid and DM contents as well as with proteases

activities while it is the opposite for L- samples. On the contrary, L- samples are better associated with extractabilities values. Finally, we can report that lipid and DM contents associated with main proteolytic activities are positively associated with L+ samples, while L- ones are rather negatively associated with those variables but positively with extractabilities values

In conclusion, this study demonstrates that both lipid and DM contents as well as main hepatic proteases activities have a strong influence on cooking losses in fatty livers issued from force-fed Mule ducks. Samples issued from animals with the highest hepatic metabolisms (both lipidic and proteic) at the time of slaughter will exhibit the highest cooking losses values. It will be now interesting to investigate why some ducks have a better adapted hepatic metabolism than others in their response to force-feeding and how to identify them as soon as possible to reduce final variability in cooking losses values recorded in processing plants. Associated to higher proteases activities, we hypothesized that more cellular degradations occurred during post mortem time and lead to a more important weakening of cellular structures associated with higher cooking losses. New investigations are currently undergoing to confirm that point.

Acknowledgements

Authors would like to thank “La Comtesse du Barry” (Gimont, France) for providing samples used in the experiment.

K. Prahkarnkaeo benefited from a grant from Royal Golden Jubilee PhD program and from French Embassy in Thailand.

REFERENCES

- (1) Salichon, M.; Guy, G.; Rousselot, D.; Blum, J. Composition of the 3 Types of Foie-Gras - Goose, Mule Duck and Muscovy Duck Foie-Gras. *Ann. Zootech.* **1994**, *43*, 213–220.
- (2) Blum, J. C.; Labie, C.; Raynaud, P. Influence du poids et de la composition chimique du foie gras d'oie sur la fonte mesurée après stérilisation à 104°C. *Sci. Aliments*, **1990**, *10*, 543–554.
- (3) Nir, I.; Nitsan, Z. Goose Fatty Liver Composition as Related to the Degree of Steatosis, Nutritional and Technological Treatments, and a Simplified Method for Quality Estimation. *Ann. Zootech.* **1976**, *25*, 461–470.
- (4) Rousselot-Pailley, D.; Guy, G.; Sellier, N.; Blum, J. Influence des conditions d'abattage et de réfrigération sur la qualité des foies gras d'oie. *INRA Prod. Anim.* **1992**, *5*, 167–172.
- (5) Theron, L.; Fernandez, X.; Marty-Gasset, N.; Pichereaux, C.; Rossignol, M.; Chambon, C.; Viala, D.; Astruc, T.; Molette, C. Identification by Proteomic Analysis of Early Post-mortem Markers Involved in the Variability in Fat Loss During Cooking of Mule Duck “Foie Gras.” *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 12617–12628.
- (6) Cazeils, J. L.; Bouillier-Oudot, M.; Auvergne, A.; Candau, M.; Babile, R. Lipid Composition of Hepatocyte Plasma Membranes from Geese Overfed with Corn. *Lipids* **1999**, *34*, 937–942.
- (7) Molette, C.; Théron, L.; Marty-Gasset, N.; Fernandez, X.; Rémignon, H. Current Advances in Proteomic Analysis of (fatty) Liver. *J. Proteomics* **2012**, *75*, 4290–4295.
- (8) Molee, W.; Bouillier-Oudot, M.; Auvergne, A.; Babilé, R. Changes in Lipid Composition of Hepatocyte Plasma Membrane Induced by Overfeeding in Duck. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *141*, 437–444.

- (9) Bax, M. L.; Chambon, C.; Marty-Gasset, N.; Remignon, H.; Fernandez, X.; Molette, C. Proteomic Profile Evolution During Steatosis Development in Ducks. *Poult. Sci.* **2012**, *91*, 112–120.
- (10) Zheng, A.; Liu, G.; Zhang, Y.; Hou, S.; Chang, W.; Zhang, S.; Cai, H.; Chen, G. Proteomic Analysis of Liver Development of Lean Pekin Duck (*Anas Platyrhynchos Domestica*). *J. Proteomics*, **2012**, *75*(17), 5396-5413.
- (11) Theron, L.; Fernandez, X.; Marty-Gasset, N.; Chambon, C.; Viala, D.; Pichereaux, C.; Rossignol, M.; Astruc, T.; Molette, C. Proteomic Analysis of Duck Fatty Liver During Post-mortem Storage Related to the Variability of Fat Loss During Cooking of “Foie Gras.” *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 920–930.
- (12) Nowak, D. Enzymes in Tenderization of Meat - The System of Calpains and Other Systems - a Review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2011**, *61*, 231–237.
- (13) Huff Lonergan, E.; Zhang, W.; Lonergan, S. M. Biochemistry of Postmortem Muscle - Lessons on Mechanisms of Meat Tenderization. *Meat Sci.* **2010**, *86*, 184–195.
- (14) Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. H. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509.
- (15) Kizaki, K.; Ushizawa, K.; Takahashi, T.; Yamada, O.; Todoroki, J.; Sato, T.; Ito, A.; Hashizume, K. Gelatinase (MMP-2 and -9) Expression Profiles During Gestation in the Bovine Endometrium. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2008**, *6*, 66.
- (16) Afonso, S.; Romagnano, L.; Babiarez, B. The Expression and Function of Cystatin C and Cathepsin B and Cathepsin L During Mouse Embryo Implantation and Placentation. *Dev. Camb. Engl.* **1997**, *124*, 3415–3425.
- (17) Raser, K. J.; Posner, A.; Wang, K. K. W. Casein Zymography: A Method to Study μ -Calpain, m-calpain, and Their Inhibitory Agents. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *319*, 211–216.

- (18) SAS, 2011 The Data Analysis for This Paper Was Generated Using SAS/STAT Software, Version 8 of the SAS System for Windows. Copyright © 2011, SAS Institute Inc. SAS and All Other SAS Institute Inc. Product or Service Names Are Registered Trademarks or Trademarks of SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- (19) Chriki, S.; Gardner, G.; Jurie, C.; Picard, B.; Micol, D.; Brun, J.-P.; Journaux, L.; Hocquette, J.-F. Cluster Analysis Application Identifies Muscle Characteristics of Importance for Beef Tenderness. *BMC Biochem.* **2012**, *13*, 29.
- (20) Fernandez, X.; Lahirigoyen, E.; Auvergne, A.; Molette, C.; Bouillier-Oudot, M. The Effects of Stunning Methods on Product Qualities in Force-fed Ducks and Geese. 1. Carcass Downgrading and Meat Quality. *Anim. Int. J. Anim. Biosci.* **2010**, *4*, 128–138.
- (21) Theron, L.; Cullere, M.; Bouillier-Oudot, M.; Manse, H.; Dalle Zotte, A.; Molette, C.; Fernandez, X.; Vitezica, Z. G. Modeling the Relationships Between Quality and Biochemical Composition of Fatty Liver in Mule Ducks. *J. Anim. Sci.* **2012**, *90*, 3312–3317.
- (22) Awde, S.; Marty-Gasset, N.; Wilkesman, J.; Rémignon, H. Proteolytic Activity Alterations Resulting from Force-feeding in Muscovy and Pekin Ducks. *Poult. Sci.* **2013**, *92*, 2997–3002.
- (23) Arthur, J. S. C.; Mykles, D. L. Calpain Zymography with Casein or Fluorescein Isothiocyanate Casein. In *Calpain Methods and Protocols*; Elce, J. S., Ed.; Methods in Molecular BiologyTM; Humana Press, **2000**; pp. 109–116.
- (24) Muyan, C.; Xiumei, Z.; Tianxiang, G.; Chao, C. Effects of Temperature, pH and NaCl on Protease Activity in Digestive Tract of Young turbot, *Scophthalmus Maximus*. *Chin. J. Ocean. Limnol.* **2006**, *24*, 300–306.

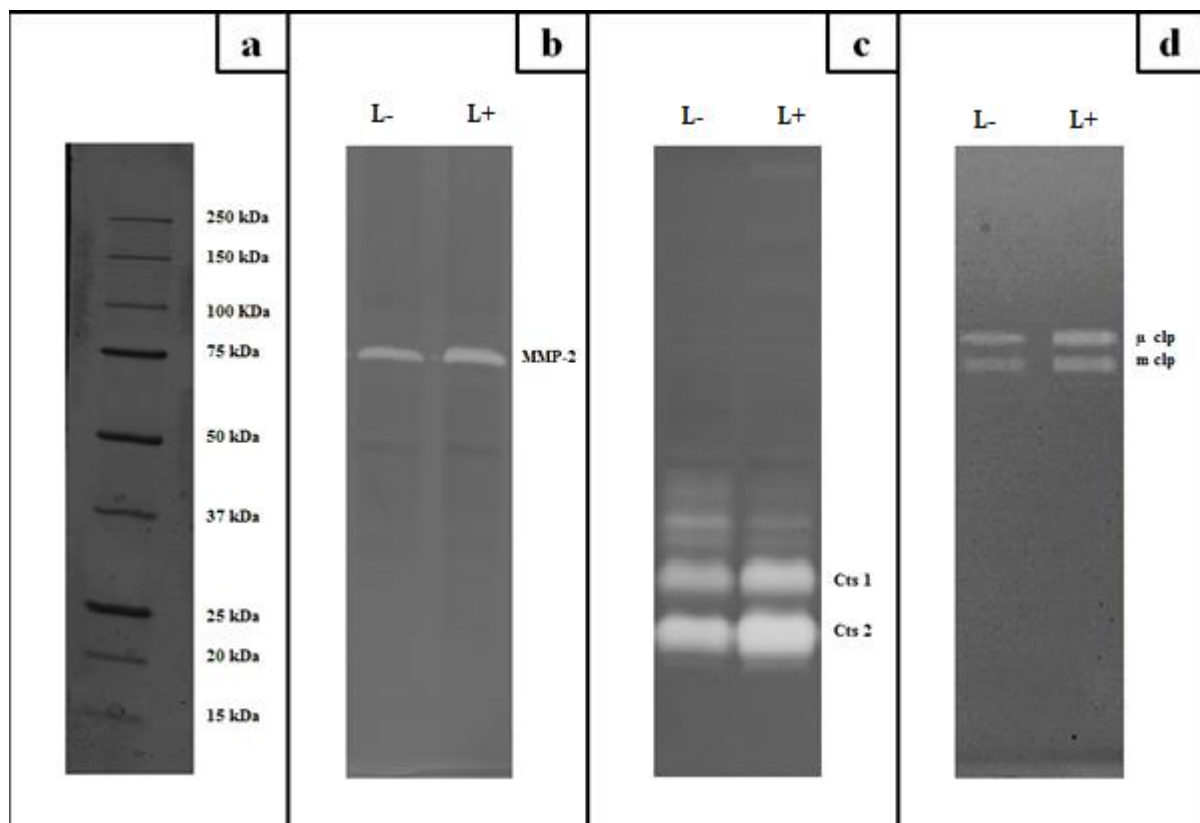


Figure 1. Molecular weight standards (a) and zymograms of the 72 kDa MMP-2 band (b), the 2 cathepsins bands (c) Cts-1 (30 kDa) & Cts-2 (25 kDa) and the μ - & m-calpains (μ -calp & m-calp) 80 kDa bands (d) analyzed by zymography in L- and L+ fatty liver samples.

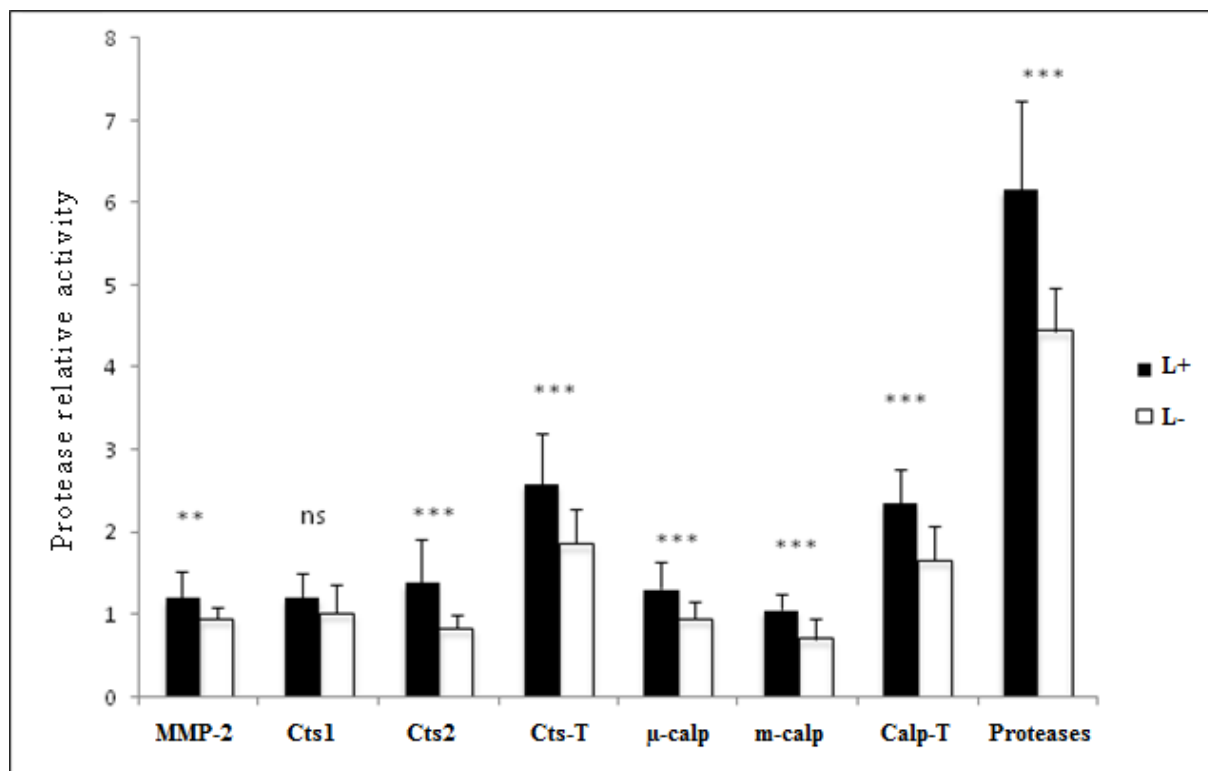


Figure 2. Proteases relative activities in L+ and L- fatty liver samples. Values are means \pm standard deviation, *** = $p < 0.001$; ** = $p < 0.01$; ns = Non significant ($p > 0.05$). MMP-2 = matrix metalloprotease 2, Ct-1 = Cathepsin isoform 1, Ct-2 = cathepsin isoform 2, Ct-T = Ct-1 + Ct-2, μ -calp = μ -calpain, m-calp = m-calpain, Calp-T = μ -calp + m-calp, proteases = MMP-2 + Ct-T + Calp-T.

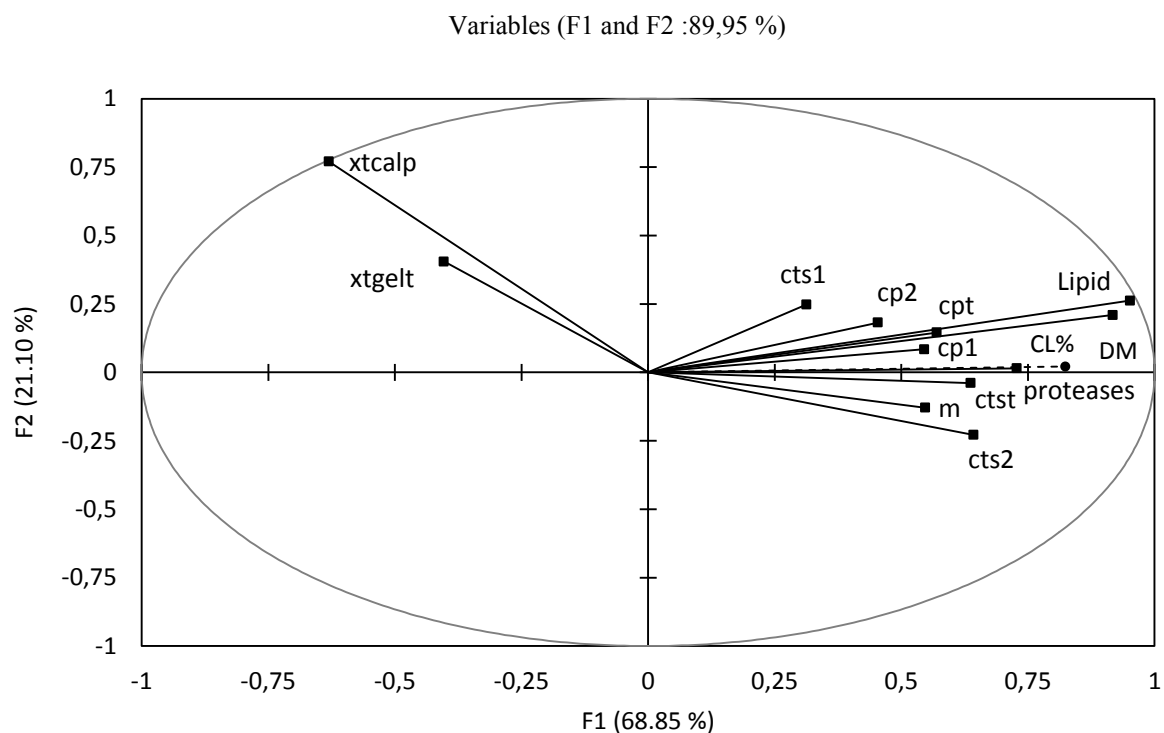


Figure 3. Plot of the first two principal component score vectors showing relationships between cooking losses and liver biochemical characteristics. m= matrix metalloprotease 2, cts1 = Cathepsin isoform 1, cts2 = cathepsin isoform 2, ctst = cts1+ cts2, cp1 = μ -calpain, cp2 = m-calpain, cpt = cp1 + cp2, proteases = m + cpt + ctst, Lipid = % lipid content, DM = % dry matter, xtgelt = extractability for gelatine degrading protease buffer, xtcalsp = extractability for casein degrading buffer. •: Added variable (CL%), ■: Active variables.

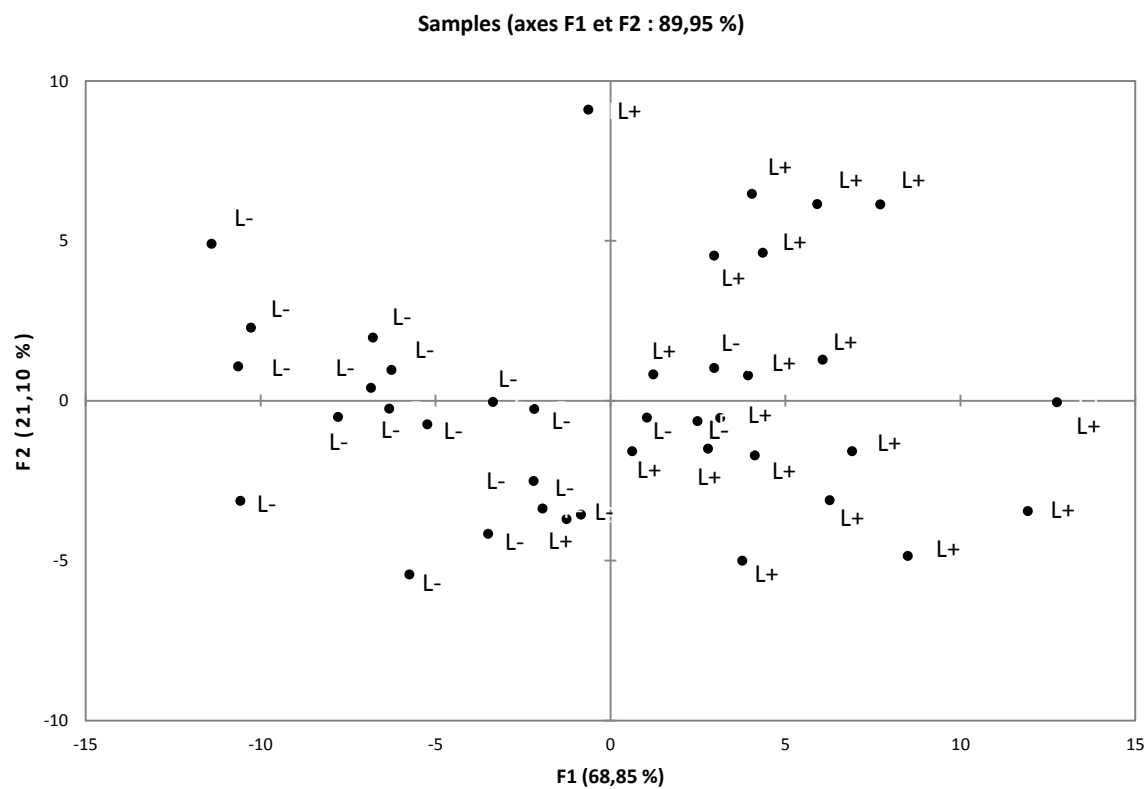


Table 1. Cooking losses (CL %) and biochemical characteristics of fatty livers from the two studied groups L- (low cooking loss) and L+ (high cooking loss). Values are expressed as means \pm standard deviation (n=20 / groups).

| | L- | L+ | <i>P</i> ¹ |
|------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| CL (%) | 20.92 \pm 4.33 | 35.99 \pm 9.97 | *** |
| Weight (g) | 519.4 \pm 12.95 | 520.3 \pm 10.23 | Ns |
| DM (%) | 63.77 \pm 2.21 | 68.96 \pm 2.23 | *** |
| Lipid (%) | 53.68 \pm 3.22 | 61.01 \pm 3.04 | *** |
| xtcalp (%) | 12.67 \pm 3.27 | 9.98 \pm 4.17 | * |
| xtgelt (%) | 12.11 \pm 1.44 | 11.47 \pm 2.03 | Ns |

¹: *** = $p < 0.001$; ** = $p < 0.01$; * = $p < 0.05$; Ns = Non significant ($p > 0.05$)

DISCUSSION GENERALE

Ce travail de thèse porte sur l'étude des protéases hépatiques et l'impact de leurs activités sur les qualités du foie gras, notamment sa fonte à la cuisson. Pour mieux comprendre les relations qui peuvent exister entre les qualités de foie gras et la protéolyse hépatique, nous avons essayé de répondre aux questions suivantes :

1) Arrive-t-on à détecter des activités protéolytiques dans le foie gras de canards?

- Si oui, lesquelles ?

2) Est-ce que les activités protéolytiques détectées sont différentes chez les canards gavés et non-gavés ?

- Si oui, quel peut-être l'effet du gavage sur les activités protéolytiques hépatiques ? Est-ce que cet effet est le même dans différents types génétiques ?

3) Quel pourrait être le rôle des protéases dans le déterminisme des qualités de foie gras ayant subi différentes méthodes de refroidissement ?

4) Existe-t-il un lien direct entre le taux de fonte du foie gras et ses activités protéolytiques ?

Pour répondre à ces questions, trois expérimentations différentes ont été menées afin de mettre en évidence les relations entre foie gras et protéolyse hépatique. La première avait comme objectif d'étudier l'effet du gavage sur l'activité des principales protéases hépatiques chez les canards et de regarder si cet effet est similaire chez des canards ayant différentes aptitudes à la stéatose. L'objectif du deuxième essai était d'étudier l'effet de différentes vitesses de refroidissement sur les niveaux d'activité protéolytiques hépatiques et par voie de conséquence sur les qualités du foie gras. La troisième avait pour but d'étudier le degré d'activités des protéases hépatiques dans deux groupes de foie gras différant par leur taux de fonte.

Détection des activités protéolytiques dans le foie gras de canards

La première partie de ces travaux de thèse était consacrée à la recherche des protéases dans le foie des canards. On s'est concentré sur trois familles de protéases i.e. les calpaïnes, les cathepsines et les MMPs. Ces protéases sont les plus étudiées dans le cas d'une stéatose hépatique pathologique (Wanninger et al., 2011 ; Gove et al., 1981 ; Rodriguez-Suarez et al., 2010). De plus, elles sont aussi connues pour affecter les qualités organoleptiques et sensorielles de la viande (Steen et al., 1997 ; Grossi et al., 2012 ; Sylvestre et al., 2002).

Les protéines représentent environ 23% de la viande rouge contre 3% pour les lipides (Williams, 2007). Par contre, le foie gras est beaucoup moins riche en protéines et beaucoup plus riche en lipides (7 et 60% respectivement (Salichon et al., 1994)). Ceci a rendu la détection des activités des protéases plus difficile puisque elles ne sont présentes qu'en très faibles quantités dans le foie gras. Néanmoins, la mise en place d'un protocole avec une étape d'élimination des lipides a été envisagée au moment de l'extraction des protéines. Deux tampons d'extraction ont ensuite été utilisés pour extraire les gélatinases (différentes isoformes de cathepsines et de MMP) et les caséinases (calpaïnes 1 et 2). Les premiers essais ont validé la présence des trois groupes des protéases chez les canards mulards, Pékin et Barbarie.

Pour confirmer les résultats obtenus, d'autres essais ont été faits comme l'identification par western blot, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des protéases concernées et une approche d'identification par spectrométrie de masse. L'identification des protéases par western blot n'a pas abouti à l'identification certaine des différentes protéases car les anticorps testés étaient développés pour d'autres espèces et ne croisaient pas chez le canard. La présence d'un substrat protéique copolymérisé dans les gels, l'autolyse possible des protéases ainsi que l'absence de la séquence complète du génome de canards (au moment des premiers essais) ont également empêché une identification correcte des protéases présentes sur les plages de lyse des zymogrammes par

spectrométrie de masse. Faute de procédure d'identification fiable des protéases détectées, nous nous sommes appuyés sur les résultats publiés pour finalement proposer une identification. Le protocole pour effectuer les zymogrammes des calpaïnes a ainsi été adapté de Raser et al., (1995). Celui-ci a permis d'obtenir, toujours en zymographie, deux bandes d'environ 80 kDa. L'activation de ces deux protéases était calcium dépendante. Ces mêmes activités étaient complètement inhibées en l'absence de calcium dans le tampon d'activation et en présence de l'inhibiteur E64. Ces résultats et l'observation des poids moléculaires enregistrés nous confirment que les deux activités détectées sont celles de la μ et la m-calpaïne. Comme pour les calpaïnes, des inhibiteurs de protéases ont été utilisés pour identifier la nature de la MMP détectée. Cette protéase à activité gélatinoïque est inhibée en présence de DTT et d'EDTA. Son poids moléculaire est d'environ 72 kDa et donc correspond à celui de la MMP-2. Une deuxième confirmation a été faite en utilisant une technique de chromatographie d'affinité ciblant spécifiquement la MMP-2 (collaboration avec l'Unité de Recherches Avicoles du centre Inra de Tours et suivant Réhault-Godbert et al., 2008). Le protocole de mise en évidence de l'activité des cathepsines a été adapté de l'étude d'Afonso et al. (1997). Chez les canards Pékin et les Barbarie trois différentes formes principales de cathepsines ont été détectées mais seulement deux chez les canards mulards. Cependant en séparant les cathepsines extraites des foies de canards gavés par zymographie bidimensionnelle nous avons détecté 7 « formes de cathepsines » dont 5 avaient le même poids moléculaire mais différents points isoélectriques. Ce résultat montre que les bandes détectées en zymographie monodimensionnelle peuvent contenir plusieurs isoformes de cathepsines ce qui rend l'identification fine des espèces cathepsiques très compliquée. Pour éviter de commettre une erreur sur la dénomination des cathepsines détectées, nous avons préféré les nommer par des chiffres (contrairement à la nomenclature officielle qui les distingue par des lettres).

L'effet du gavage sur les activités protéolytiques

Après avoir montré que le foie gras contient bien des protéases actives *post mortem*, nous avons cherché à comparer les activités protéolytiques chez deux types génétiques de canards, maigres ou gras, connus pour leurs différentes aptitudes au gavage.

Les mesures zootechniques ont montré que le canard de Barbarie présente toujours un poids vif et un poids de foie plus importants que ceux du canard Pékin et ce indépendamment du régime considéré (avec ou sans gavage). La semi-quantification des activités protéolytiques a ensuite montré que tandis que les cathepsines et la m-calpaïne avaient des activités équivalentes chez les deux races étudiées, l'activité de la MMP-2 chez les canards de Barbarie était toujours plus élevée que celle des Pékin. Au contraire, l'activité de la μ -calpaïne était plus faible chez les Barbarie que chez les canards Pékin. L'observation de différences entre les activités relatives de protéases entre ces deux races n'est pas forcément surprenante. En fait, de nombreuses études ont comparé les performances zootechniques ainsi que le métabolisme hépatique du canard de Barbarie avec ceux du canard Pékin (Chartrin et al., 2006 ; Hermier et al., 2003 ; Davail et al., 2003). Il est donc bien connu que le canard de Barbarie a une meilleure susceptibilité au gavage que le Pékin. Les résultats obtenus dans notre première expérience sont en accord avec ceux retrouvés dans d'autres études. Les canards de Barbarie produisent non seulement un foie plus lourd mais aussi qui fond moins que celui issu du gavage des canards Pékin (Blum et al., 1992). C'est une des raisons qui fait que le canard Pékin n'est pas utilisé pour produire du foie gras.

Par contre, ce qui nous intéressait plus dans cette étude c'était de comparer la réaction des protéases hépatiques de chacun des deux types génétiques en réponse au gavage et non pas la quantité absolue des protéases. Chez l'homme, ainsi que chez la plupart des autres mammifères, la stéatose est considérée comme un état pathologique (Baffy et al., 2012b ; Grieco et al., 2005). Dans ce cas, comme pour beaucoup d'autres maladies hépatiques, les activités et/ou l'expression des protéases sont augmentées chez les sujets malades par rapport aux sujets sains. Cependant, on ne savait pas si c'est aussi le cas lors d'une stéatose d'origine alimentaire comme celle résultant du

gavage chez les palmipèdes à foie gras. Dans notre étude, les mesures d'activité des protéases ont montré que celles de la MMP-2 et de la m-calpaïne étaient diminuées avec le gavage dans les deux races étudiées. Au contraire, le gavage n'a pas affecté les activités des trois formes de cathepsines détectées ni celle de la μ -calpaïne.

Globalement, ces résultats issus de la première expérience montrent que les deux races étudiées réagissent de la même manière au gavage. Nous avons aussi pu démontrer que, contrairement à ce qui se passe dans le cas d'une stéatose hépatique pathologique (alcool, médicaments) qui induit dans la plupart des cas une élévation des activités protéolytiques, les activités protéolytiques dans le cas d'une stéatose hépatique d'origine alimentaire chez les palmipèdes restent constantes ou diminuent avec le gavage. Cette tendance est donc résolument tournée vers une diminution du catabolisme protéique hépatique qui pourrait s'expliquer par une adaptation des hépatocytes à la forte augmentation du métabolisme général dû à des entrées massives biquotidiennes de glucides. En réponse, les protéases auraient donc tendance à réduire leurs activités sans doute pour faciliter l'adaptation cellulaire nécessaire à la synthèse, l'exportation et le stockage des lipides néo-synthétisés. Néanmoins, cette adaptabilité doit avoir une limite et il serait intéressant de refaire de telles mesures dans des foies ayant atteints des valeurs de stéatose plus élevées (foies plus gros ou en limite physiologique) qui les positionneraient dans un état plus proches de la limite pathologique.

Activité protéolytique et qualité de foie

Parmi les différentes composantes de la qualité du foie gras, dans ces travaux de thèse, nous avons choisi de travailler principalement sur le taux de fonte à la cuisson et accessoirement sur la texture du foie frais. Cette dernière qualité a été simplement abordée dans la deuxième expérience alors que la fonte a été évaluée dans la deuxième et la troisième expérience.

Dans le muscle, les protéases jouent un rôle primordial dans le déterminisme de la qualité de la viande. En effet, c'est sous l'action des protéases endogènes que la viande s'attendrit *post mortem* (Morgan et al., 1993 ; Steen et al., 1997). Ceci est dû à notamment la dégradation de certaines protéines musculaires structurales. Ce phénomène est apprécié dans la viande mais est non désiré dans la chair de poisson (Cheret et al., 2007). Pour mieux contrôler ce paramètre, de nombreuses études ont été faites dans le muscle (King et al., 2003 ; Devine et al., 1999) et au cours de sa transformation en viande. Parmi les éléments affectant la qualité de la maturation, la température de refroidissement des viandes a été montrée comme étant une des plus importantes (Ali et al., 2008 ; Petäjä et al., 1985).

Dans le foie gras, la texture est aussi considérée comme étant un paramètre important de sa qualité (Bouillier-Oudot et al., 2000 ; Goullieux et Chanut, 2006). En effet, l'augmentation de la dureté du foie gras est associée à une élévation de son taux de fonte à la cuisson (Cazeils, 2000). A partir de ce qui a été déjà montré dans le muscle concernant l'effet des protéases sur la texture du tissu, notre hypothèse de départ était donc : est-ce qu'une température de refroidissement des foies plus rapide et plus forte peut diminuer significativement les activités protéolytiques et donc altérer l'évolution *post mortem* de la biochimie du foie gras ?

Ce raisonnement trouve une application empirique sur le terrain. En effet, les transformateurs de foie gras ont remarqué qu'en éviscérant les foies « à froid » i.e. après le refroidissement de la carcasse entière, la fonte lipidique à la cuisson est supérieure à celle obtenue en transformant des foies éviscérés à chaud (Rousselot-Pailley et al., 1992). Ce fait est pris en considération par les producteurs du foie gras et l'éviscération à froid est en voie de disparition. Le refroidissement du foie gras se fait donc aujourd'hui très tôt après son éviscération et sa transformation finale quand il a atteint une température à coeur voisine de 10°C pour des facilités de manipulation (déveinage et dénervage). Pour cela, de nombreuses méthodes de refroidissement sont utilisées (Goullieux et Chanut, 2006). Notre hypothèse de départ était donc qu'en laissant peu d'opportunités (en

refroidissant vite et tôt) aux protéases de détruire un maximum de protéines, on préserverait mieux l'intégrité cellulaire et ainsi on aurait une meilleure résistance aux effets destructeurs de la cuisson.

La deuxième partie de ce travail de thèse avait donc pour objectif de tester différentes vitesses de refroidissement et ainsi d'établir un possible lien entre activités protéolytiques plus ou moins ralenties et qualités du foie gras. Pour cela, on a construit un schéma expérimental dans lequel on a croisé l'effet du refroidissement (3 vitesses différentes : UF, F et S) avec celui du temps (2 temps : T1 et T2). En pratique, les foies sont généralement transformés au temps T1 c'est à dire quand leur température interne est autour de 10°C. Dans cette étude, nous avons aussi considéré un temps plus éloigné (24 h post mortem) qui peut être aussi rencontré sur le terrain quand la transformation n'a pas pu avoir eu lieu plus tôt. Les foies UF (Ultra-Fast ou ultra rapide) ont atteint la température interne de 10°C (T1) à 50 min post mortem. Les F (Fast ou rapide) et les S (Slow ou lent) ont atteint cette même température à 120 et 210 min respectivement. Les mesures de texture montrent que les foies F et S étaient plus durs que ceux du groupe F. Ceci est en accord avec les résultats de Goullieux et Chanut (2006), qui montre que les foies ayant subis le refroidissement le plus lent avaient la texture la plus dure. L'effet du refroidissement plus ou moins rapide sur la fonte n'est observable qu'à partir du temps T2=24h *post mortem*. En parallèle, des mesures protéomiques ont été effectuées. Nos résultats montrent qu'au temps T1 on ne peut pas mettre en évidence de réelles différences entre les trois traitements vis à vis des activités protéolytiques mesurées. Par contre, nous avons remarqué que le temps post mortem n'avait pas le même effet dans les trois groupes étudiés. En effet, seuls les foies UF présentaient des altérations des activités protéolytiques uniquement au niveau des calpaïnes. Les foies F avaient des activités altérées avec le temps post mortem pour la MMP-2 et les calpaïnes. Enfin, toutes les activités protéolytiques mesurées étaient significativement modifiées pour les foies S au temps T2. Il semble donc bien que la vitesse de refroidissement initiale ait un impact sur les valeurs d'activités protéolytiques mesurées au moins pour le temps le plus tardif. On peut aussi se demander si ces altérations ne sont pas dues à des temps de séjour à 4°C plus

longs pour les foies refroidis dans les conditions les plus lentes. L'analyse des profils protéiques par SDS-PAGE confirme la présence d'une protéolyse hépatique au cours du temps de stockage post mortem. De plus, et bien que les analyses statistiques n'aient pas montré de différences significatives entre les trois traitements en ce qui concerne la semi-quantification des différentes bandes, l'identification des espèces majoritaires dans celles-ci par spectrométrie de masse montre qu'elles sont différentes pour les trois traitements au temps T2. Par exemple, la myosine, dont le poids moléculaire est de 223 kDa apparaît à T2 chez les UF et les F à la suite de sa dégradation partielle dans la bande à 180 kDa et n'est pas détectée chez les S. Ceci est probablement dû à une dégradation plus importante de cette protéine de structure chez les S ce qui a conduit à la formation de fragments de plus petite taille qui auront pu migrer plus loin dans le gel. Malheureusement nous n'avons pas pu identifier toutes les bandes du gel SDS-PAGE dans cette étude et donc cette hypothèse n'est pas totalement validée. Néanmoins, la présence d'une plus grande diversité moléculaire dans la bande 90 kDa uniquement dans le groupe S à T2 est une raison supplémentaire de penser que ce groupe a subi plus de protéolyse que les deux autres. Ces résultats, associés aux paramètres technologiques mesurés, suggèrent que les différentes méthodes de refroidissement utilisées ont peu d'effets sur les qualités de foie gras si la transformation se déroule assez tôt après la mort de l'animal (au temps T1). Par contre, au-delà de ce temps des différences entre les trois traitements apparaissent et une méthode de refroidissement rapide doit être préférée si on veut limiter le taux de fonte.

Après avoir montré que la température de refroidissement et le temps de stockage qui précède la transformation peuvent avoir un effet sur les activités protéolytiques et donc sur les qualités de foie gras, nous avons cherché à savoir si des activités protéolytiques différentes pouvaient expliquer une variation du taux de fonte telle que celle observée sur le terrain dans des conditions identiques de température et de temps de stockage. La troisième expérience a donc été menée dans le but d'étudier la relation entre la variabilité de la fonte à la cuisson intra-lot et l'intensité des activités protéolytiques. La fonte à la cuisson est pratiquement considérée comme étant le problème le plus

important pour les industriels de la filière de transformation des foies gras. Bien que de nombreux paramètres aient été identifiés comme étant impliqués dans le déterminisme de la fonte à la cuisson des foies gras celle-ci n'est toujours pas maîtrisée. Parmi ces paramètres, on peut citer des éléments de nature biologique tels que le type génétique et l'âge à la mise en gavage (Salichon et al., 1994 ; Baudonnet, 1993), ou de nature technologique tels que la durée du jeûne et le moment de l'éviscération (Babilé, 1989 ; Rousselot-Pailley et al., 1992). Cependant, malgré tous les efforts faits pour contrôler ce taux de fonte, il demeure toujours une part de sa variabilité qui est non expliquée.

Pour générer un maximum de variabilité de ce taux de fonte, nous avons choisi de nous mettre dans un contexte de terrain. Ainsi, si l'éviscération a été faite à chaud, la vitesse de refroidissement des foies a elle été assez lente (chambre froide à 4°C). Les résultats obtenus montrent que le groupe de foie à fonte élevée présente des activités protéolytiques toujours plus élevées que celles mesurées dans les foies gras présentant une fonte faible. Ces résultats valident en partie l'hypothèse formulée par Theron et al. (2011) et disant que la protéolyse post mortem est plus importante dans les foies à fonte élevée. Par contre, notre analyse en composantes principales montre que le taux de lipides hépatiques reste prépondérant par rapport au niveau des activités protéolytiques mesurées dans le déterminisme de la fonte lipidique à la cuisson.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans ces travaux de thèse on a pu mettre en évidence la présence des activités protéolytiques appartenant à trois familles de protéases et qui sont les MMPs, les cathepsines et les calpaïnes. On a réussi à identifier avec une quasi-certitude les espèces de protéases identifiées avec les protocoles calpaïnes et MMPs. Cependant, l'identité des isoformes cathepsiques nous est toujours inconnue. Il semble donc indispensable de mener d'autres essais afin de lever cette incertitude d'identification. Il serait aussi intéressant d'essayer de rechercher d'autres protéases hépatiques (autres MMP, protéasome, caspases, ...) qui pourraient aussi être impliquées dans le déterminisme de certaines qualités du foie gras.

Les résultats obtenus dans la première expérience montrent que les activités protéolytiques diminuent avec le gavage. Ceci suggère que contrairement au cas de la stéatose d'origine pathologique, dans le cas d'une stéatose alimentaire chez les palmipèdes à foie gras, le tissu hépatique tend plutôt vers plus d'anabolisme. On a aussi remarqué qu'il existe peu de différences entre les activités protéolytiques des deux types génétiques, contrairement à ce quoi on s'attendait. Il serait maintenant intéressant de voir si les canards mulards, qui sont encore plus performants en termes de productivité en gavage, se comportent également de la même manière. Une autre étude sur la production de foie gras d'oie sans gavage a été menée récemment et ceci en prolongeant considérablement la durée d'élevage et il serait aussi intéressant de savoir si cette tendance vers plus d'anabolisme est également présente dans ce cas-là.

L'effet de la vitesse de refroidissement sur les activités protéolytiques et les qualités du foie gras a aussi été mise en évidence. Nous avons montré que l'adoption d'une vitesse de refroidissement rapide est primordiale pour améliorer le taux de fonte à la cuisson surtout si la transformation doit se faire en léger différé. La persistance des activités protéolytiques *post mortem* pourrait être étudiée de façon plus prolongée, à la manière de ce qui a été publié pour la maturation des viandes, car même si cela existe peu dans le monde professionnel, il serait intéressant de connaître pendant combien de temps les activités des protéases peuvent persister et quelles dégradations elles sont susceptibles de

faire dans les structures cellulaires. En effet, notre étude s'est limitée aux 24 premières heures post mortem ce qui est peu au regard du temps probablement nécessaire à la réelle perception du fruit du travail des enzymes protéolytiques hépatiques *post mortem*.

Malgré les similarités observées entre la protéolyse *post mortem* dans le foie et celles dans le muscle, il est important de noter que contrairement à ce qui se passe dans la viande, l'accélération de la vitesse de refroidissement ralentie bien les phénomènes de protéolyse mais ceci donne une texture plus ferme au foie ! D'autres phénomènes liés à l'état des lipides stockés doivent donc être en jeu et finalement peser plus sur le déterminisme de la texture que les dégradations cellulaires dues aux protéases.

Nous avons aussi montré que la variabilité de la fonte au sein d'un même lot de canards peut être partiellement expliquée par une différence du niveau d'activité des enzymes protéolytiques. Ainsi, plus les protéases sont actives, plus la fonte des foies à la cuisson serait importante. Mais le taux de lipides dans les foies reste un facteur déterminant de sa capacité à fondre. Ainsi, il serait maintenant intéressant de comparer des foies gras pouvant présenter des poids de foie et des teneurs en lipides hépatiques similaires mais des taux de fonte significativement différents. On peut alors s'attendre à ce que les activités protéolytiques observées diffèrent d'un groupe de fonte à l'autre comme ce fut le cas dans notre seconde expérience.

De façon beaucoup plus globale, nos études ont montré la faisabilité de l'étude des activités protéolytiques dans le foie gras de canards et le lien plus ou moins fort qu'elles pouvaient avoir certaines propriétés du foie gras (fonte, texture). Toutefois, il ne faut pas oublier que les mesures rapportées ici sont celles du métabolisme hépatique à un instant t sans que l'on sache si les activités mesurées peuvent être dues à une augmentation du nombre d'enzymes concernées ou bien à une diminution de la disponibilité en co-facteurs ou inhibiteurs des protéases concernées. Dans cette perspective des essais devrait être conduits prochainement au laboratoire pour mieux comprendre les

mécanismes biologiques qui sous-tendent le déterminisme de la fonte des foies gras et si des moyens supplémentaires (génétiques ? zootechniques ? technologiques ? pharmacologiques ?) peuvent être mobilisés pour la réduire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A DUCASTAING D.J.E., 1978, « Purification of bovine spleen collagenolytic cathepsin, (cathepsin N). », *Biochemical Society transactions*, 6, 5, p. 938-40.
- AFONSO S., ROMAGNANO L., BABIARZ B., 1997, « The expression and function of cystatin C and cathepsin B and cathepsin L during mouse embryo implantation and placentation », *Development (Cambridge, England)*, 124, 17, p. 3415-3425.
- ALI M.S., YANG H.S., JEONG J.Y., MOON S.H., HWANG Y.H., PARK G.B., JOO S.T., 2008, « Effect of Chilling Temperature of Carcass on Breast Meat Quality of Duck », *Poultry Science*, 87, 9, p. 1860-1867.
- ALWAYN I.P.J., ANDERSSON C., LEE S., ARSENAULT D.A., BISTRIAN B.R., GURA K.M., NOSE V., ZAUSCHER B., MOSES M., PUDER M., 2006, « Inhibition of matrix metalloproteinases increases PPAR-alpha and IL-6 and prevents dietary-induced hepatic steatosis and injury in a murine model », *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 291, 6, p. G1011-1019.
- ASAGIRI M., TAKAYANAGI H., 2007, « The molecular understanding of osteoclast differentiation », *Bone*, 40, 2, p. 251-264.
- AUVERGNE A., 1992, *Facteurs de variation de la composition corporelle et tissulaire des canards avant et après gavage.*, Thèse Docteur d'Etat, Toulouse, INP, 252 p.
- BABILE R., 1989, *La production de foies gras de canards de Barbarie (Cairina Moschata). Aspects génétiques, nutritionnels et technologiques.*, Thèse de Docteur d'Etat, Toulouse, INP, 315 p.
- BABILE R., AUVERGNE A., 1986, « qualité de foie gras comparaison de différentes méthodes d'appréciation de la fonte lipidique ; Evolution en fonction du temps », *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 162, , p. 151-156.
- BABILE R., AUVERGNE A., DUBOIS J.-P., BENARD G., MANSE H., 1996, « Réversibilité de la stéatose hépatique chez le canard mulard », p. 107-110.
- BABILE R., AUVERGNE A., DUBOIS J.-P., BENARD G., MANSE H., 1998, « Réversibilité de la stéatose hépatique chez l'oie », p. 45-48.
- BABILE R., AUVERGNE A., SETIAWAN I., JOLY E., LATIL G., 1993, « Conduite alimentaire au cours du gavage des canards et qualité technologique du foie gras », p. 107-116.
- BAEZA E., CHARTRIN P., DAVAIL S., HOO-PARIS R., MOUROT J., GUY G., BERNADET M.-D., JUIN H., METEAU K., HERMIER D., 2005, « Canards de Barbarie, Pékin et leurs hybrides : aptitude à l'engraissement », *INRA Productions Animales*, 18, 2, p. 131-141.
- BAFFY G., BRUNT E.M., CALDWELL S.H., 2012b, « Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace », *Journal of hepatology*, 56, 6, p. 1384-1391.

- BAIRLEIN F., 1987, « Nutritional requirements for maintenance of body weight and fat deposition in the long-distance migratory garden warbler, *Sylvia borin* (Boddaert) », *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 86, 2, p. 337-347.
- BAKER A.H., EDWARDS D.R., MURPHY G., 2002, « Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities », *Journal of cell science*, 115, Pt 19, p. 3719-3727.
- BASKIN-BEY E.S., CANBAY A., BRONK S.F., WERNEBURG N., GUICCIARDI M.E., NYBERG S.L., GORES G.J., 2005, « Cathepsin B inactivation attenuates hepatocyte apoptosis and liver damage in steatotic livers after cold ischemia-warm reperfusion injury », *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 288, 2, p. G396-402.
- BAUDONNET C., 1993, *Facteurs de variation de la composition biochimique et de la qualité technologique des foies gras de canards*, Thèse de Doctorat Production animale et qualité de denrées, Toulouse, INP, 364 p.
- BAUDONNET-LENFANT C., AUVERGNE A., BABILE R., 1991, « Influence de la durée de jeûne avant l'abattage et du poids à la mise en gavage des canards de Barbarie sur la composition chimique hépatique », *Annales de Zootechnie*, 40, 3, p. 161-170.
- BAX M.L., CHAMBON C., MARTY-GASSET N., REMIGNON H., FERNANDEZ X., MOLETTE C., 2012, « Proteomic profile evolution during steatosis development in ducks », *Poultry science*, 91, 1, p. 112-120.
- BELKIN A.M., AKIMOV S.S., ZARITSKAYA L.S., RATNIKOV B.I., DERYUGINA E.I., STRONGIN A.Y., 2001, « Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion », *The Journal of biological chemistry*, 276, 21, p. 18415-18422.
- BENARD G., LABIE C., 1998, « Evolution histologique du foie de palmipèdes au cours du gavage », p. 31-35.
- BLANCHET X., 2010, *analyse du déterminisme génétique et de gènes responsables de la variabilité de la tendreté des viandes bovines*, text, Université de Limoges, 240 p.
- BLUM J.C., LABIE C., RAYNAUD P., 1990, « Influence du poids et de la composition chimique du foie gras d'oie sur la fonte mesurée après stérilisation à 104°C », *Sciences des aliments*, 10, 3, p. 543-554.
- BLUM J.-C., MONACHON G., LECLERCQ B., 1971, « Liver steatosis of force-fed geese as influenced by the protein level of the diet. », *Acta veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*, 21, 2, p. 307-11.
- BLUM J.-C., SALICHON M.-R., GUY G., ROUSSELOT-PAILLET D., 1992, « Comparative development chemical composition and quality - GetInfo », *XIX World's Poultry Congress*, p. 240-244.
- BODEN G., SONG W., KRESGE K., MOZZOLI M., CHEUNG P., 2008, « Effects of hyperinsulinemia on hepatic metalloproteinases and their tissue inhibitors », *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 295, 3, p. E692-697.

- BOUILLIER-LOUDOT M., LEPRETTRE S., DUBOIS J.-P., BABILE R., 2002, « Itinéraires post mortem et caractéristiques technologiques et organoleptiques des foies gras d'oies », p. 172-175.
- BOUILLIER-LOUDOT M., LEPRETTRE S., DUBOIS J.-P., BABILE R., 2004, « evolution de la composition hépatique lors du refroidissement post mortem de foies gras d'oies dans la carcasse », p. 203-206.
- BOUILLIER-LOUDOT M., CAZEILS J.L., BABILE R., AUVERGNE A., 2000, « Relation entre la composition de la membrane plasmique des hépatocytes de foies gras d'oies et leurs caractéristiques technologiques et organoleptiques », p. 139-142.
- BREDDAM K., 1986, « Serine carboxypeptidases. A review », *Carlsberg Research Communications*, 51, 2, p. 83-128.
- CANBAY A., GUICCIARDI M.E., HIGUCHI H., FELDSTEIN A., BRONK S.F., RYDZEWSKI R., TANIAI M., GORES G.J., 2003, « Cathepsin B inactivation attenuates hepatic injury and fibrosis during cholestasis », *The Journal of clinical investigation*, 112, 2, p. 152-159.
- CAZEILS J.L., BOUILLIER-LOUDOT M., AUVERGNE A., CANDAU M., BABILE R., 1999, « Lipid composition of hepatocyte plasma membranes from geese overfed with corn », *Lipids*, 34, 9, p. 937-942.
- CAZEILS J.-L., 2000, *Caractérisation de la composition lipidique des membranes plasmiques des hépatocytes de foies d'oies : relation avec le rendement technologique des foies gras*, Toulouse, INPT.
- CHAPMAN H.A. JR, MUNGER J.S., SHI G.P., 1994, « The role of thiol proteases in tissue injury and remodeling », *American journal of respiratory and critical care medicine*, 150, 6 Pt 2, p. S155-159.
- CHARLTON M.R., 1996, « Protein metabolism and liver disease », *Baillière's clinical endocrinology and metabolism*, 10, 4, p. 617-635.
- CHARTRIN P., BERNADET M.-D., GUY G., MOUROT J., HOCQUETTE J.-F., RIDEAU N., DUCLOS M.J., BAÉZA E., 2006, « Does overfeeding enhance genotype effects on liver ability for lipogenesis and lipid secretion in ducks? », *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 145, 3, p. 390-396.
- CHATTERJEE R., KALNITSKY G., 1986, « The specificity of rabbit lung cathepsin I on biopeptides », *Biomedica biochimica acta*, 45, 11-12, p. 1447-1455.
- CHERET R., DELBARRELADRAT C., LAMBALLERIEANTON M., VERREZBAGNIS V., 2007, « Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles », *Food Chemistry*, 101, 4, p. 1474-1479.
- CHUNG C., SHUGRUE C., NAGAR A., DOLL J.A., CORNWELL M., GATTU A., KOLODECIK T., PANDOL S.J., GORELICK F., 2009, « Ethanol exposure depletes hepatic pigment epithelium-derived factor, a novel lipid regulator », *Gastroenterology*, 136, 1, p. 331-340.e2.
- DAVAIL S., GUY G., ANDRÉ J., HERMIER D., HOO-PARIS R., 2000, « Metabolism in two breeds of geese with moderate or large overfeeding induced liver-steatosis », *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 126, 1, p. 91-99.

- DAVAIL S., RIDEAU N., GUY G., ANDRÉ J.-M., HERMIER D., HOO-PARIS R., 2003, « Hormonal and metabolic responses to overfeeding in three genotypes of ducks », *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 134, 4, p. 707-715.
- DEMARTINO G.N., GILLETTE T.G., 2007, « Proteasomes: machines for all reasons », *Cell*, 129, 4, p. 659-662.
- DEVINE C.E., WAHLGREN N.M., TORNBORG E., 1999, « Effect of rigor temperature on muscle shortening and tenderisation of restrained and unrestrained beef m. longissimus thoracicus et lumborum », *Meat Science*, 51, 1, p. 61-72.
- EVANS A.J., 1972, « In vitro lipogenesis in the liver and adipose tissues of the female Aylesbury duck at different ages. », *British poultry science*, 13, 6, p. 595-602.
- FABBRINI E., SULLIVAN S., KLEIN S., 2010, « Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications », *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51, 2, p. 679-689.
- FERNANDEZ X., BOUILLIER-LOUDOT M., MOLETTE C., BERNADET M.D., MANSE H., 2011, « Duration of transport and holding in lairage at constant postprandial delay to slaughter--effects on fatty liver and breast muscle quality in mule ducks », *Poultry science*, 90, 10, p. 2360-2369.
- FERREIRA D.M.S., CASTRO R.E., MACHADO M.V., EVANGELISTA T., SILVESTRE A., COSTA A., COUTINHO J., CAREPA F., CORTEZ-PINTO H., RODRIGUES C.M.P., 2011, « Apoptosis and insulin resistance in liver and peripheral tissues of morbidly obese patients is associated with different stages of non-alcoholic fatty liver disease », *Diabetologia*, 54, 7, p. 1788-1798.
- FOLK J.-E., SCHIRMER E.-W., 1963, « The porcine pancreatic carboxypeptidase a system. I. Three forms of the active enzyme », *The Journal of biological chemistry*, 238, , p. 3884-3894.
- FOURNIER E., PERESSON R., GUY G., HERMIER D., 1997, « Relationships between storage and secretion of hepatic lipids in two breeds of geese with different susceptibility to liver steatosis », *Poultry science*, 76, 4, p. 599-607.
- GOHDA E., PITOT H.C., 1981, « Purification and characterization of a new thiol proteinase from rat kidney », *Biochimica et biophysica acta*, 659, 1, p. 114-122.
- GOLL D.E., OTSUKA Y., NAGAINIS P.A., SHANNON J.D., SATHE S.K., MUGURUMA M., 1983, « Role of Muscle Proteinases in Maintenance of Muscle Integrity and Mass », *Journal of Food Biochemistry*, 7, 3, p. 137-177.
- GOLL D.E., THOMPSON V.F., LI H., WEI W., CONG J., 2003, « The calpain system », *Physiological reviews*, 83, 3, p. 731-801.
- GOULLIEUX I., CHANUT I., 2006, « Quantification de la dureté et de la couleur du foie gras cru : influence des techniques de refroidissement »,.
- GOVE C.D., WARDLE E.N., WILLIAMS R., 1981, « Circulating lysosomal enzymes and acute hepatic necrosis », *Journal of clinical pathology*, 34, 1, p. 13-16.

- GRIECO A., FORGIONE A., MIELE L., VERO V., GRECO A.V., GASBARRINI A., GASBARRINI G., 2005, « Fatty liver and drugs », *European review for medical and pharmacological sciences*, 9, 5, p. 261-263.
- GROSSI A., GKARANE V., OTTE J.A., ERTBJERG P., ORLIEN V., 2012, « High pressure treatment of brine enhanced pork affects endopeptidase activity, protein solubility, and peptide formation », *Food Chemistry*, 134, 3, p. 1556-1563.
- GRYNSPAN F., GRIFFIN W.B., MOHAN P.S., SHEA T.B., NIXON R.A., 1997, « Calpains and calpastatin in SH-SY5Y neuroblastoma cells during retinoic acid-induced differentiation and neurite outgrowth: comparison with the human brain calpain system », *Journal of neuroscience research*, 48, 3, p. 181-191.
- GUEMENE D., GUY G., FAURE J.-M., 2004, « Foie-Gras, gavage et bien-être animal : vers un peu d'objectivité ! Le point sur l'évolution des pratiques de production et les acquis de la recherche », *6èmes Journées de la recherche sur les palmipèdes à Foie Gras*, p. 81-87.
- GUICCIARDI M.E., DEUSSING J., MIYOSHI H., BRONK S.F., SVINGEN P.A., PETERS C., KAUFMANN S.H., GORES G.J., 2000, « Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c », *The Journal of clinical investigation*, 106, 9, p. 1127-1137.
- HAMELET J., COUTY J.-P., CRAIN A.-M., NOLL C., POSTIC C., PAUL J.-L., DELABAR J.-M., VIGUIER M., JANEL N., 2009, « Calpain activation is required for homocysteine-mediated hepatic degradation of inhibitor Ikappa B alpha », *Molecular Genetics and Metabolism*, 97, 2, p. 114-120.
- HAN Y.-P., 2006, « Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis », *Journal of gastroenterology and hepatology*, 21 Suppl 3, , p. S88-91.
- HANSON R.W., BALLARD F.J., 1967, « The relative significance of acetate and glucose as precursors for lipid synthesis in liver and adipose tissue from ruminants », *The Biochemical journal*, 105, 2, p. 529-536.
- HASSANEIN M., BOJJA A.S., GLAZEWSKI L., LU G., MASON R.W., 2009, « Protein processing by the placental protease, cathepsin P », *Molecular Human Reproduction*, 15, 7, p. 433-442.
- HEDSTROM L., 2002, « Serine Protease Mechanism and Specificity », *Chemical Reviews*, 102, 12, p. 4501-4524.
- HERBST H., HEINRICHS O., SCHUPPAN D., MILANI S., STEIN H., 1991, « Temporal and spatial patterns of transin/stromelysin RNA expression following toxic injury in rat liver », *Virchows Archiv B*, 60, 1, p. 295-300.
- HERMIER D., ROUSSELOT-PAILLEY D., PERESSON R., SELLIER N., 1994, « Influence of orotic acid and estrogen on hepatic lipid storage and secretion in the goose susceptible to liver steatosis », *Biochimica et biophysica acta*, 1211, 1, p. 97-106.
- HERMIER D., SAADOUN A., SALICHON M.R., SELLIER N., ROUSSELOT-PAILLET D., CHAPMAN M.J., 1991, « Plasma lipoproteins and liver lipids in two breeds of geese with different susceptibility to hepatic steatosis: changes induced by development and force-feeding », *Lipids*, 26, 5, p. 331-339.

- HERMIER D., GUY G., GUILLAUMIN S., DAVAIL S., ANDRÉ J.-M., HOO-PARIS R., 2003, « Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in two species of ducks », *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 135, 4, p. 663-675.
- HOOPER A.J., ADAMS L.A., BURNETT J.R., 2011, « Genetic determinants of hepatic steatosis in man », *Journal of lipid research*, 52, 4, p. 593-617.
- HSING L.C., RUDENSKY A.Y., 2005, « The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation », *Immunological reviews*, 207, , p. 229-241.
- IMURO Y., BRENNER D.A., 2008, « Matrix Metalloproteinase Gene Delivery for Liver Fibrosis », *Pharmaceutical Research*, 25, 2, p. 249-258.
- INAMI Y., YAMASHINA S., IZUMI K., UENO T., TANIDA I., IKEJIMA K., WATANABE S., 2011, « Hepatic steatosis inhibits autophagic proteolysis via impairment of autophagosomal acidification and cathepsin expression », *Biochemical and biophysical research communications*, 412, 4, p. 618-625.
- J.O.C.E, 1971, « Dosage de l'humidité », *Journal officiel des communautés Européennes*, L 279/8, .
- KADOWAKI M., KANAZAWA T., 2003, « Amino acids as regulators of proteolysis », *The Journal of nutrition*, 133, 6 Suppl 1, p. 2052S-2056S.
- KAKEHASHI H., NISHIOKU T., TSUKUBA T., KADOWAKI T., NAKAMURA S., YAMAMOTO K., 2007, « Differential Regulation of the Nature and Functions of Dendritic Cells and Macrophages by Cathepsin E », *The Journal of Immunology*, 179, 9, p. 5728-5737.
- KING D.A., DIKEMAN M.E., WHEELER T.L., KASTNER C.L., KOOHMARAIE M., 2003, « Chilling and cooking rate effects on some myofibrillar determinants of tenderness of beef », *Journal of animal science*, 81, 6, p. 1473-1481.
- KONTTINEN Y., AINOLA M., VALLEALA H., MA J., IDA H., MANDELIN J., KINNE R., SANTAVIRTA S., SORSA T., LOPEZ-OTIN C., TAKAGI M., 1999, « Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis », *Annals of the Rheumatic Diseases*, 58, 11, p. 691-697.
- LATIL G., AUVERGNE A., BABILE R., 1996, « Consommation du canard mulard en gavage. Relations avec les performances zotechniques et la qualité technologique du foie gras. », p. 93-97.
- LEE H.L., SANTÉ-LHOUTELLIER V., VIGOUROUX S., BRIAND Y., BRIAND M., 2007, « Calpain specificity and expression in chicken tissues », *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 146, 1, p. 88-93.
- LEPRETTRE S., DUBOIS J.-P., BOUILLIER-LOUDOT M., BABILE R., 2002, « Technique de gavage des oies : Incidence de la fréquence des repas et de la durée du gavage sur les performances et les caractéristiques technologiques et organoleptiques des foies gras. », p. 122-125.
- LEVEILLE G.A., ROMSOS D.R., YEH Y., O'HEA E.K., 1975, « Lipid biosynthesis in the chick. A consideration of site of synthesis, influence of diet and possible regulatory mechanisms », *Poultry science*, 54, 4, p. 1075-1093.

LIEBER C.S., DECARLI L.M., SORRELL M.F., 1989, « Experimental methods of ethanol administration », *Hepatology*, 10, 4, p. 501-510.

LIMAYE P.B., APTE U.M., SHANKAR K., BUCCI T.J., WARBRITTON A., MEHENDALE H.M., 2003, « Calpain released from dying hepatocytes mediates progression of acute liver injury induced by model hepatotoxicants », *Toxicology and applied pharmacology*, 191, 3, p. 211-226.

LINGVAY I., RASKIN P., SZCZEPANIAK L.S., 2007, « Effect of insulin-metformin combination on hepatic steatosis in patients with type 2 diabetes », *Journal of diabetes and its complications*, 21, 3, p. 137-142.

LIU C.-W., YANG D.-J., CHANG Y.-Y., HSU C.-L., TSENG J.-K., CHANG M.-H., WANG M., CHEN Y.-C., 2012, « Polyphenol-rich longan (*Dimocarpus longan* Lour.)-flower-water-extract attenuates nonalcoholic fatty liver via decreasing lipid peroxidation and downregulating matrix metalloproteinases-2 and -9 », *Food Research International*, 45, 1, p. 444-449.

LIU X., HE R., HUANG C., LI X., ZHOU Q., WANG C., ZHAO N., ZHOU S., 2006, « Hepatic Lipogenesis Associated with Biochemical Changes in Overfed Landaise Geese and China Xupu Geese », *Agricultural Sciences in China*, 5, 5, p. 390-396.

MARTINEZ I., WANG P.A., SLIZYTÉ R., JORGE A., DAHLE S.W., CAÑAS B., YAMASHITA M., OLSEN R.L., ERIKSON U., 2011, « Protein expression and enzymatic activities in normal and soft textured Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle », *Food Chemistry*, 126, 1, p. 140-148.

MCKERROW J.H., 1999, « Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action », *International journal for parasitology*, 29, 6, p. 833-837.

MEIJER V.E. DE, SVERDLOV D.Y., POPOV Y., LE H.D., MEISEL J.A., NOSÉ V., SCHUPPAN D., PUDER M., 2010, « Broad-Spectrum Matrix Metalloproteinase Inhibition Curbs Inflammation and Liver Injury but Aggravates Experimental Liver Fibrosis in Mice », *PLoS ONE*, 5, 6, p. e11256.

MOHAMED M.M., SLOANE B.F., 2006, « Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer », *Nature reviews. Cancer*, 6, 10, p. 764-775.

MORGAN J.B., WHEELER T.L., KOOHARAIE M., SAVELL J.W., CROUSE J.D., 1993, « Meat tenderness and the calpain proteolytic system in longissimus muscle of young bulls and steers », *Journal of animal science*, 71, 6, p. 1471-1476.

MOUROT J., GUY G., LAGARRIGUE S., PEINIAU P., HERMIER D., 2000, « Role of hepatic lipogenesis in the susceptibility to fatty liver in the goose (*Anser anser*) », *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 126, 1, p. 81-87.

MOUROT J., KOUBA M., 1999, « Development of intra- and intermuscular adipose tissue in growing large white and Meishan pigs », *Reproduction, nutrition, development*, 39, 1, p. 125-132.

NAGASE H., WOESSNER J.F. JR, 1999, « Matrix metalloproteinases », *The Journal of biological chemistry*, 274, 31, p. 21491-21494.

- NAKAMURA H., FUJII Y., OHUCHI E., YAMAMOTO E., OKADA Y., 1998, « Activation of the precursor of human stromelysin 2 and its interactions with other matrix metalloproteinases », *European journal of biochemistry / FEBS*, 253, 1, p. 67-75.
- NIKAWA T., TOWATARI T., KATUNUMA N., 1992, « Purification and characterization of cathepsin J from rat liver », *European journal of biochemistry / FEBS*, 204, 1, p. 381-393.
- NIKKOLA J., VIHINEN P., VUORISTO M.-S., KELLOKUMPU-LEHTINEN P., KÄHÄRI V.-M., PYRHÖNEN S., 2005, « High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma », *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11, 14, p. 5158-5166.
- OHSHITA T., KOMINAMI E., II K., KATUNUMA N., 1986, « Effect of starvation and refeeding on autophagy and heterophagy in rat liver », *Journal of biochemistry*, 100, 3, p. 623-632.
- BAR-OR A., NUTTALL R.K., DUDDY M., ALTER A., KIM H.J., IFERGAN I., PENNINGTON C.J., BOURGOIN P., EDWARDS D.R., YONG V.W., 2003, « Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis », *Brain: a journal of neurology*, 126, Pt 12, p. 2738-2749.
- PAN X., HUSSAIN F.N., IQBAL J., FEUERMAN M.H., HUSSAIN M.M., 2007, « Inhibiting proteasomal degradation of microsomal triglyceride transfer protein prevents CCl₄-induced steatosis », *The Journal of biological chemistry*, 282, 23, p. 17078-17089.
- PAN Z., WANG J., KANG B., LU L., HAN C., TANG H., LI L., XU F., ZHOU Z., LV J., 2010, « Screening and identification of differentially expressed genes in goose hepatocytes exposed to free fatty acid », *Journal of cellular biochemistry*, 111, 6, p. 1482-1492.
- PENDÁS A.M., KNÄUPER V., PUENTE X.S., LLANO E., MATTEI M.G., APTE S., MURPHY G., LÓPEZ-OTÍN C., 1997, « Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution », *The Journal of biological chemistry*, 272, 7, p. 4281-4286.
- PETÄJÄ E., KUKKONEN E., PUOLANNE E., 1985, « Effect of post-mortem temperature on beef tenderness », *Meat science*, 12, 3, p. 145-154.
- PILCHER B.K., WANG M., QIN X.J., PARKS W.C., SENIOR R.M., WELGUS H.G., 1999, « Role of matrix metalloproteinases and their inhibition in cutaneous wound healing and allergic contact hypersensitivity », *Annals of the New York Academy of Sciences*, 878, , p. 12-24.
- POWELL W.C., FINGLETON B., WILSON C.L., BOOTHBY M., MATRISIAN L.M., 1999, « The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis », *Current biology: CB*, 9, 24, p. 1441-1447.
- RAGHUNATH M., BADGUJAR S., 2010, « Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review », *Journal of Pharmacy Research*, 3, 9, p. 2048-2068.
- RANI K., RANA R., DATT S., 2012a, « Biological Aspects of Proteolytic Enzymes: A Review », *International Journal of Current Life Sciences*, 2, 1, p. 12-18.

- RANI K., RANA R., DATT S., 2012b, « Review on latest overview of proteases », *International Journal of Current Life Sciences*, 2, 1, p. 12-18.
- RAO M.B., TANKSALE A.M., GHATGE M.S., DESHPANDE V.V., 1998, « Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases », *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 3, p. 597-635.
- RASER K.J., POSNER A., WANG K.K., 1995, « Casein zymography: a method to study mu-calpain, m-calpain, and their inhibitory agents », *Archives of biochemistry and biophysics*, 319, 1, p. 211-216.
- RÉHAULT-GODBERT S., GAUTRON J., LABAS V., BELGHAZI M., NYS Y., 2008, « Identification and characterization of the precursor of chicken matrix metalloprotease 2 (pro-MMP-2) in hen egg », *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 15, p. 6294-6303.
- RHOADES R., BELL D.R., 2013, *Medical physiology: principles for clinical medicine*, Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- RICHARD I., BROUX O., ALLAMAND V., FOUGEROUSSE F., CHIANNILKULCHAI N., BOURG N., BRENGUIER L., DEVAUD C., PASTURAUD P., ROUDAUT C., 1995, « Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A », *Cell*, 81, 1, p. 27-40.
- ROBIN N., BABILE R., PEYHORGUE A., DUBOIS J.-P., LEPRETTRE S., 2004, « facteurs de production et qualité des foies gras de canards et d'oies », p. 157-165.
- RODRIGUEZ-SUAREZ E., DUCE A.M., CABALLERIA J., ARRIETA F.M., FERNANDEZ E., GOMARA C., ALKORTA N., ARIZ U., MARTINEZ-CHANTAR M.L., LU S.C., ELORTZA F., MATO J.M., 2010, « Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Proteomics », *Proteomics. Clinical applications*, 4, 4, p. 362-371.
- ROUSSELOT-PAILLEY D., GUY G., GOURICHON D., SELLIER N., BLUM J.-C., 1992, « Influence des conditions d'abattage et de réfrigération sur la qualité des foies gras d'oie », *INRA Production Animale*, 5, , p. 167-172.
- ROUSSET-AKRIM S., BAYLE M.-C., MARTIN J.-F., TOURAILLE C., 1994, « Comment distinguer par évaluation sensorielle les foies gras d'oie et de canard? Etude préliminaire », *Sciences des aliments*, 14, 6, p. 777-784.
- SAADOUN A., LECLERCQ B., 1987, « In vivo lipogenesis of genetically lean and fat chickens: effects of nutritional state and dietary fat », *The Journal of nutrition*, 117, 3, p. 428-435.
- SAKAMOTO E., SAKAO Y., TANIGUCHI Y., YAMAFUJI K., 1999, « Cathepsin Y (a novel thiol enzyme) produces kinin potentiating peptide from the component protein of rat plasma », *Immunopharmacology*, 45, 1-3, p. 207-214.
- SAKON M., KISHIMOTO S., UMESHITA K., NAGANO H., WANG M., DOHNO K., NAKAMORI S., ARIYOSHI H., KAWASAKI T., GOTOH M., MONDEN M., 1998, « Activation of calpain μ in the diseased liver », *Gastroenterology*, 114, , p. A1331-A1331.
- SALICHON M., GUY G., ROUSSELOT D., BLUM J., 1994, « Composition des 3 types de foie gras : oie, canard mulard et canard de Barbarie », *Annales de Zootechnie*, 43, 2, p. 213-220.

SAUVANT D., PEREZ J.-M., TRAN G., INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (FRANCE) I. NATIONAL AGRONOMIQUE P.-G., ASSOCIATION FRANCAISE DE ZOOTECHNIE, 2004, *Tables of composition and nutritional value of feed materials: pigs, poultry, cattle, sheep, goats, rabbits, horses and fish*, Wageningen; Paris, Wageningen Academic Publishers ; INRA.

SHIMADA T., NAKAMURA H., OHUCHI E., FUJII Y., MURAKAMI Y., SATO H., SEIKI M., OKADA Y., 1999, « Characterization of a truncated recombinant form of human membrane type 3 matrix metalloproteinase », *European journal of biochemistry / FEBS*, 262, 3, p. 907-914.

SILLER-LÓPEZ F., SANDOVAL A., SALGADO S., SALAZAR A., BUENO M., GARCIA J., VERA J., GÁLVEZ J., HERNÁNDEZ I., RAMOS M., AGUILAR-CORDOVA E., ARMENDARIZ-BORUNDA J., 2004, « Treatment with human metalloproteinase-8 gene delivery ameliorates experimental rat liver cirrhosis », *Gastroenterology*, 126, 4, p. 1122-1133; discussion 949.

SKRZYDLEWSKA E., SKRZYDLEWSKI Z., WOROWSKI K., 1997, « Activity of liver proteases in experimental methanol intoxication », *Acta biochimica Polonica*, 44, 2, p. 339-342.

SOL-CHURCH K., FRENCK J., MASON R.W., 2000a, « Cathepsin Q, a novel lysosomal cysteine protease highly expressed in placenta », *Biochemical and biophysical research communications*, 267, 3, p. 791-795.

SOL-CHURCH K., FRENCK J., MASON R.W., 2000b, « Mouse cathepsin M, a placenta-specific lysosomal cysteine protease related to cathepsins L and P », *Biochimica et biophysica acta*, 1491, 1-3, p. 289-294.

SORIMACHI H., KINBARA K., KIMURA S., TAKAHASHI M., ISHIURA S., SASAGAWA N., SORIMACHI N., SHIMADA H., TAGAWA K., MARUYAMA K., SUZUKI K., 1995, « Muscle-specific Calpain, p94, Responsible for Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2A, Associates with Connectin through IS2, a p94-specific Sequence », *Journal of Biological Chemistry*, 270, 52, p. 31158-31162.

SORIMACHI H., SUZUKI K., 2001, « The Structure of Calpain », *Journal of Biochemistry*, 129, 5, p. 653-664.

SOROKIN A.V., KIM E.R., OVCHINNIKOV L.P., 2009, « Proteasome system of protein degradation and processing », *Biochemistry Bio himiia*, 74, 13, p. 1411-1442.

SPOEL A. VAN DER, BONTEN E., AZZO A. D', 1998, « Transport of human lysosomal neuraminidase to mature lysosomes requires protective protein/cathepsin A. », *The EMBO Journal*, 17, 6, p. 1588-1597.

STAMENKOVIC I., 2003, « Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases », *The Journal of pathology*, 200, 4, p. 448-464.

STEEN D., CLAEYS E., UYTTERHAEGEN L., SMET S. DE, DEMEYER D., 1997, « Early post-mortem conditions and the calpain/calpastatin system in relation to tenderness of double-musled beef », *Meat science*, 45, 3, p. 307-319.

STEFFENSEN B., HÄKKINEN L., LARJAVA H., 2001, « Proteolytic events of wound-healing--coordinated interactions among matrix metalloproteinases (MMPs), integrins, and extracellular

matrix molecules », *Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists*, 12, 5, p. 373-398.

SYLVESTRE M.N., BALCERZAK D., FEIDT C., BARACOS V.E., BELLUT J.B., 2002, « Elevated rate of collagen solubilization and postmortem degradation in muscles of lambs with high growth rates: Possible relationship with activity of matrix metalloproteinases », *Journal of Animal Science*, 80, 7, p. 1871-1878.

TANAKA K., 2009, « The proteasome: overview of structure and functions », *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 85, 1, p. 12-36.

TAYLOR A., 1993, « Aminopeptidases: structure and function. », *The FASEB Journal*, 7, 2, p. 290-298.

TETLOW L.C., ADLAM D.J., WOOLLEY D.E., 2001, « Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes », *Arthritis and rheumatism*, 44, 3, p. 585-594.

THÉRON L., ASTRUC T., BOUILLIER-LOUDOT M., MOLETTE C., VÉNIEN A., PEYRIN F., VITEZICA Z.G., FERNANDEZ X., 2011, « The fusion of lipid droplets is involved in fat loss during cooking of duck "foie gras" », *Meat science*, 89, 4, p. 377-383.

THERON L., 2011, *Déterminisme biologique de la variabilité de la fonte lipidique à la cuisson du foie gras de canard*, PhD Thesis.

THERON L., FERNANDEZ X., MARTY-GASSET N., PICHEREAUX C., ROSSIGNOL M., CHAMBON C., VIALA D., ASTRUC T., MOLETTE C., 2011, « Identification by proteomic analysis of early post-mortem markers involved in the variability in fat loss during cooking of mule duck "foie gras" », *Journal of agricultural and food chemistry*, 59, 23, p. 12617-12628.

TIDBALL J.G., SPENCER M.J., 2000, « Calpains and muscular dystrophies », *The international journal of biochemistry & cell biology*, 32, 1, p. 1-5.

TURK B., 2006, « Targeting proteases: successes, failures and future prospects », *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 9, p. 785-799.

TURK B., STOKA V., 2007, « Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins », *FEBS letters*, 581, 15, p. 2761-2767.

VISSE R., NAGASE H., 2003, « Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Structure, Function, and Biochemistry », *Circulation Research*, 92, 8, p. 827-839.

VOYNICK I.M., FRUTON J.S., 1971, « The Comparative Specificity of Acid Proteinases », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68, 2, p. 257-259.

WANG M.Y., TSAI M.Y., WANG C., 1994, « Identification of chicken liver glucose transporter », *Archives of biochemistry and biophysics*, 310, 1, p. 172-179.

WANNINGER J., WALTER R., BAUER S., EISINGER K., SCHÄFFLER A., DORN C., WEISS T.S., HELLERBRAND C., BUECHLER C., 2011, « MMP-9 activity is increased by adiponectin in primary

human hepatocytes but even negatively correlates with serum adiponectin in a rodent model of non-alcoholic steatohepatitis », *Experimental and molecular pathology*, 91, 2, p. 603-607.

WART H.E.V., BIRKEDAL-HANSEN H., 1990, « The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 14, p. 5578-5582.

WILLIAMS P., 2007, « Nutritional composition of red meat », *Nutrition & Dietetics*, 64, , p. S113-S119.

WU J., LIU J., WAALKES M.P., CHENG M.-L., LI L., LI C.-X., YANG Q., 2008, « High dietary fat exacerbates arsenic-induced liver fibrosis in mice », *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 233, 3, p. 377-384.

YOSHIKAWA Y., MUKAI H., HINO F., ASADA K., KATO I., 2000, « Isolation of two novel genes, down-regulated in gastric cancer », *Japanese journal of cancer research: Gann*, 91, 5, p. 459-463..

ANNEXES

Détermination de taux de lipides

I. Objet et domaine d'application

L'objectif est de déterminer le taux des lipides dans un échantillon de foie gras.

La détermination des lipides est effectuée par une méthode dérivant de la méthode de (Folch, Lees, & SLOANE-STANLEY, 1957).

II. Principe de la méthode

Les lipides totaux sont extraits à froid en traitant l'échantillon par un mélange chloroforme/méthanol. L'échantillon broyé sous forme de poudre lyophilisée est placé dans le mélange de solvants, puis homogénéisé et laissé en contact avec le mélange solvant une nuit à 4°C. Après filtration, la séparation de la phase chloroformique contenant les extraits lipidiques et de la phase méthanolique contenant les autres constituants est réalisée par addition d'une solution saline miscible avec le méthanol. Après décantation, un prélèvement de la phase chloroformique est effectué et la quantification des lipides totaux est obtenue par gravimétrie après évaporation complète du chloroforme.

III. Matériels nécessaires

- Balance de précision à 0.1mg
- Homogénéiseur de type Polytron ou Ultra-Turrax muni d'une sonde de $\varnothing 10\text{mm}$
- Bain réfrigérant
- Système d'évaporation de solvants Speedvac
- Agitateur vibreur ou de type vortex
- Tubes type SVL 50ml avec bouchon
- Entonnoirs verre
- Filtres quantitatifs $\varnothing 110\text{mm}$ (Fisher grade 12 ref 19534)
- Pipettes graduées 10ml à 2 traits et propipette pour solvants
- Tubes Wheaton 15ml à bouchon téflonné
- Chloroforme pour analyses
- Méthanol p.a.
- Sodium chlorure p.a.
- Le mélange solvant Chloroforme/méthanol (2/1, v/v) est préparé lors de l'utilisation.
- Solution saline NaCl (125.5mM) Broyeur Fast-Prep 24

IV. Mode opératoire

Extraction des lipides :

Peser environ 0.4g en frais (PE) à la balance de précision

Introduire ce prélèvement dans un tube de 50ml

Ajouter 30ml de mélange-solvant chloroforme/méthanol

Homogénéiser l'ensemble 30s au Polytron (18000trs/mn)

Rincer avec 10ml de mélange solvant (2 x 5ml) la tige de l'homogénéiseur tout en maintenant le tube au-dessous afin de récupérer le solvant (V = 40ml)

Bien fermer le tube avec le bouchon et placer à 4°C pour limiter les phénomènes d'oxydation et d'évaporation.

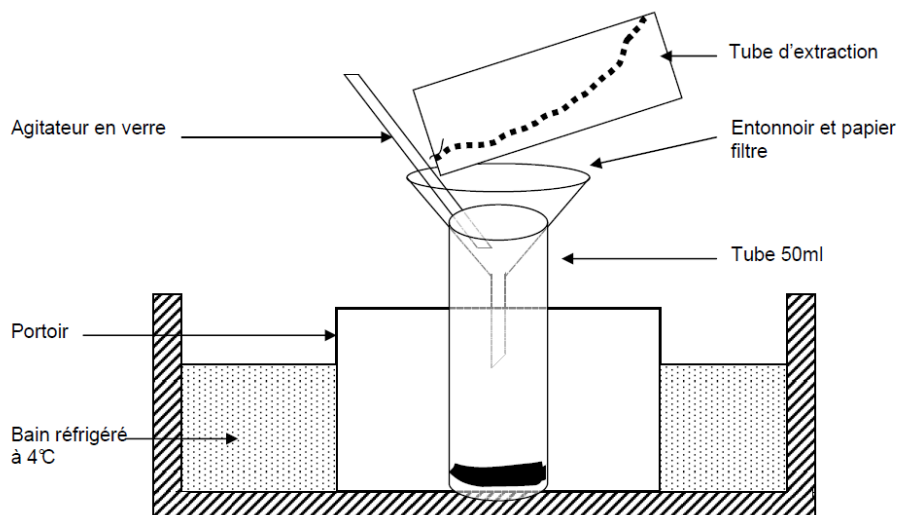
Laisser une nuit afin de réaliser une extraction complète.

Filtration (schéma) :

Placer les tubes 50ml pour la filtration dans le bain réfrigéré à 4°C

Ajouter un volume V_s ($V_s = V \times 0.2$) de solution saline (soit 8ml)

Filtrer au moyen de l'entonnoir verre muni du filtre et de l'agitateur en verre
 Récupérer le maximum de solution filtrée dans le tube. (Opérer rapidement en raison de l'évaporation des solvants)
 Bien fermer le tube avec le bouchon



Séparation des phases :

Agiter vivement les tubes au vortex ou par retournements
 Laisser les tubes au froid pendant la durée de la décantation
 Attendre jusqu'à l'obtention de la limpidité de la phase inférieure (minimum 2h à 3h) ou centrifuger 20mn à 1200g (procédure accélérée).

Prélèvement des lipides totaux :

Prélever un volume V_{lip} de 10ml à la pipette à 2 traits de la phase chloroformique (phase inférieure)
 Introduire ce volume V_{lip} dans un tube Wheaton préalablement taré, identifié par gravure du verre de préférence et bien fermé.
 Stocker au congélateur dans l'attente de l'évaporation.
 Après évaporation du chloroforme au Speedvac et séchage du tube dans un dessiccateur sous vide
 Peser le tube Wheaton à la balance de précision pour déterminer le résidu R de lipides.

V. Expression des résultats

$$\% \text{ Lipides totaux} = (2 \times V \times R \times 100) / (3 \times V_{lip} \times PE)$$

VI. Consignes de sécurité

Préambule : il est conseillé de travailler si possible dans une pièce climatisée avec une température n'excédant jamais 18°C et impérativement sous hotte aspirante et muni d'équipements de protection !

VII. Gestion des déchets

Jeter la solution chloroforme/méthanol dans les bidons déchets

VIII. Références bibliographiques

Folch, J., Lees, M., & SLOANE-STANLEY, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.

Extraction et dosage des gélatinases

I. Objet et domaine d'application

Extraction et dosages des protéases dégradant la gélatine (cathepsines et MMP) .

L'extraction des gélatinases est effectuée par une méthode dérivant de (Kizaki et al., 2008).

II. Matériels nécessaires

Broyeur à bille type Fast-Prep 24

Centrifugeuse

Vortex

Spectrophotomètre

Eppendorfs (2 ml et 250 µl)

Tube 5 ml

Billes en verre

Pipettes (10 µl, 200µl et 5 ml) et multipettes

Cuves

III. Réactifs (chimiques et biologiques)

Solution de BSA à 2mg/ml

Ampoules de solution de BSA 2mg/ml.

Réactif de Bradford SIGMA

TP extraction Kizaki (4°C)

Pour 500 ml

| | | | |
|--------|----|---------------------|-----------|
| 3.029 | g | Tris Base pH 7.5 | (50 mM) |
| 4.383 | g | NaCl | (150 mM) |
| 0.0735 | g | CaCl ₂ | (1 mM) |
| 250 | µl | Brij-35 | (0.05%) |
| 1 | ml | Leupeptine (5mg/ml) | (10µg/ml) |
| 5 | ml | PMSF | (1 mM) |

IV. Mode opératoire

Extraction des protéines

Dans un tube (v=2ml), Peser ≈ 75mg d'échantillon de foie broyé.

Ajouter 1.5 ml de **TP d'extraction kizaki** + 2 billes en verre.

Broyage 20sec avec le Fast-Prep 24(TANDEM-INRA)

Centrifugation : 12000g, 15 min, 4°C

Enlever le fat-cake.

Récupérer le surnageant, aliquoter et garder les échantillons à -20°C.

Dans un tube à 5 ml, ajouter 100 µl de tous les échantillons (celui-ci va servir à faire le Pool Kizaki), vortexer et aliquoter dans des petits éppendorfs de 200 µl.

} 2X

Dosage des protéines

Le dosage des protéines se fait selon la méthode de (Bradford, 1976)

| Tubes | Diluant = tampon d'extraction | BSA | [BSA] finale |
|-------|-------------------------------|------------------------------|--------------|
| A | 150 µl | 450 µl solution BSA à 2mg/ml | 1500 µg /ml |
| B | 390 µl | 390 µl solution BSA à 2mg/ml | 1000 µg/ml |
| C | 210 µl | 210µl A | 750 µg/ml |
| D | 390 µl | 390µl B | 500 µg/ml |
| E | 390 µl | 390 µl D | 250 µg/ml |
| F | 390 µl | 390 µl E | 125µg/ml |
| G | 480 µl | 120 µl F | 25 µg/ml |
| H | 360 µl | 0 | 0 µg/ml |

Dans des tubes de 5ml (3 répliques pour la gamme ainsi que pour tous les échantillons)

Pour les différents points de la gamme : 100 µl + 3 ml de **réactif de Bradford**

Pour les échantillons : (10µl échantillon +90 µl TP extraction Kizaki) + 3ml réactif de Bradford.

Dilution au 1/10^{ème}

V. Consignes de sécurité

Manipuler le réactif Bradford sous hotte aspirante.

VI. Gestion des déchets

Jeter la solution Bradford dans les bidons déchets colorants ou déchets Bradford

VII. Références bibliographiques

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3

Kizaki, K., Ushizawa, K., Takahashi, T., Yamada, O., Todoroki, J., Sato, T., ... Hashizume, K. (2008). Gelatinase (MMP-2 and -9) expression profiles during gestation in the bovine endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 6, 66. doi:10.1186/1477-7827-6-66

Extraction et dosage des caséinases

I. Objet et domaine d'application

Extraction et dosages des protéases dégradant la caséine (calpaines).

L'extraction des gélatinases est effectuée par une méthode dérivant de la méthode de (Raser, Posner, & Wang, 1995)

II. Matériels nécessaires

Broyeur à bille type Fast-Prep 24

Centrifugeuse

Vortex

Spectrophotomètre

Eppendorfs (2 ml et 250 µl)

Tube 5 ml

Billes en verre

Pipettes (10 µl, 200µl et 5 ml) et multipettes

Cuves

III. Réactifs (chimiques et biologiques)

Solution de BSA à 2mg/ml

Ampoules de solution de BSA 2mg/ml.

Réactif de Bradford SIGMA

TP extraction calpaines (4°C)

Pour 500 ml

3.028 g Tris Base (50mM)

2.9 g EDTA (20mM)

1.9 g EGTA (10mM)

500 µl β-Mercaptoéthanol (0.1%)

pH 8.8

IV. Mode opératoire

Extraction des protéines

Dans un tube (v=2ml), Peser ≈ 300 mg d'échantillon de foie broyé.

Ajouter 1.5 ml de **TP d'extraction calpaines** + 2 billes en verre.

Broyage 20sec avec le Fast-Prep 24(TANDEM-INRA)

Centrifugation : 12000g, 15 min, 4°C

Enlever le fat-cake.

Récupérer le surnageant, aliquoter et garder les échantillons à -20°C.

Dans un tube à 5 ml, ajouter 100 µl de tous les échantillons (celui-ci va servir à faire le Pool calpaines), vortexer et aliquoter dans des petits éppendorfs de 200 µl.

2X

Dosage des protéines

Le dosage des protéines se fait selon la méthode de (Bradford, 1976)

| Tubes | Diluant = tampon d'extraction | BSA | [BSA] finale |
|-------|-------------------------------|------------------------------|--------------|
| A | 150 µl | 450 µl solution BSA à 2mg/ml | 1500 µg /ml |
| B | 390 µl | 390 µl solution BSA à 2mg/ml | 1000 µg/ml |
| C | 210 µl | 210µl A | 750 µg/ml |
| D | 390 µl | 390µl B | 500 µg/ml |
| E | 390 µl | 390 µl D | 250 µg/ml |
| F | 390 µl | 390 µl E | 125µg/ml |
| G | 480 µl | 120 µl F | 25 µg/ml |
| H | 360 µl | 0 | 0 µg/ml |

Dans des tubes de 5ml (3 répliques pour la gamme ainsi que pour tous les échantillons)

Pour les différents points de la gamme : 100 µl + 3 ml de **réactif de Bradford**

Pour les échantillons : (5µl échantillon +95 µl TP extraction calpaines) + 3ml réactif de Bradford.

Dilution au 1/20^{ème}

V. Consignes de sécurité

Manipuler le tp d'extraction calpaines réactif Bradford sous hotte aspirante.

VI. Gestion des déchets

Jeter le TP calpaines, et les connes à pipettes dans les bidons déchets CMR liquides et solides respectivement.

Jeter la solution Bradford dans les bidons déchets colorants ou déchets Bradford

VII. Références bibliographiques

- Raser, K. J., Posner, A., & Wang, K. K. (1995). Casein zymography: a method to study mu-calpain, m-calpain, and their inhibitory agents. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 319(1), 211–216. doi:10.1006/abbi.1995.1284
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3

Détection de la MMP-2 par Zymographie mono-dimensionnelle

I. Objet et domaine d'application

L'objectif est de semi-quantifier l'activité de la protéase MMP-2 dans un échantillon de foie gras.

La détermination l'activité de la MMP-2 est effectuée par une méthode dérivant de la méthode de Kizaki et al. (2008)

II. Principe de la méthode

Les protéines sont séparées selon leurs poids moléculaire sur un gel SDS-PAGE où un substrat protéique (gélatine) a été ajouté avant la polymérisation du gel. Après migration le SDS est éliminé (en rinçant avec un détergeant tel que le triton-X 100) afin de dénaturer les protéases. Le gel est ensuite incubé 18h à 37°C dans le tampon d'activation. Après coloration les bandes blanches qui apparaissent, correspondent aux endroits où le substrat a été dégradé et donc à la protéase.

III. Matériels nécessaires

- Système mini-gels (1 mm spacers; 5ml/mini-gel /Bio-Rad)
- Vortex
- Cuve 4 gels
- Générateur
- Agitateur
- Etuve

IV. Réactifs (chimiques et biologiques)

TP extraction Kizaki (4°C)

| | | | |
|-------------|----|---------------------|-----------|
| Pour 500 ml | | | |
| 3.029 | g | Tris Base pH 7.5 | (50 mM) |
| 4.383 | g | NaCl | (150 mM) |
| 0.0735 | g | CaCl ₂ | (1 mM) |
| 250 | μl | Brij-35 | (0.05%) |
| 1 | ml | Leupeptine (5mg/ml) | (10μg/ml) |
| 5 | ml | PMSF | (1 mM) |

Tris Base-HCl, 1.5M, pH=8.8 (4°C)

Pour 500ml
90.855 g Tris Base

Tris Base-HCl, 0.5M, pH=6.8 (4°C)

Pour 250 ml
15.155 g Tris base

Solution SDS 10%

Pour 100 ml
10 g SDS

Solution ZnCl₂ 10 mM (4°C)

Pour 10 ml
0.014 g Zncl₂

TP échantillon (-20°C)

Pour 5 ml de tampon

| | | | |
|------|----|---------------------------|---------|
| 1.5 | ml | Tris Base/HCl 0.5M pH 6.8 | (150mM) |
| 1.5 | ml | Glycérol | (30%) |
| 2 | ml | SDS 10% | (4%) |
| 0.01 | g | BrB | (0.2%) |
| 20 | μl | ZnCl ₂ 10mM | (40μM) |

Solution Gélatine à 3% (4°C)

Pour 25 ml

0.75 g Gélatine

Ajouter 20 ml d'eau et faire chauffer la solution pour mieux dissoudre la gélatine

Ajuster le volume à 25 ml, aliquoter dans des éppendorfs de 2 ml et conserver à 4°C.

Composition des Gels (quantités pour 4 mini gels ; 1mm épaisseur)

| Réactifs | Gel de séparation (vf=20 ml) | Gel de concentration |
|---------------------------|------------------------------|-----------------------|
| Gélatine 3% | 1 ml (0.15%) | - |
| Eau UP | 5.6 ml | 3 ml |
| Acrylamide 40% | 6 ml (12%) | 480 μl |
| Bis-acrylamide 2% | 1.2 ml | 250 μl |
| Tris Base/HCl 1.5M pH 8.8 | 5 ml (1.5M pH 8.8) | 1.25 ml (0.5M pH 6.8) |
| Glycérole | 1 ml | - |
| SDS 10% | 200 μl | - |
| APS 10% | 100 μl | 25 μl |
| TEMED | 10 μl | 5 μl |

TP de migration (4°C)

Pour 1L ; [X5]

72 g Glycine

15.1 g Tris- base

10 g SDS

TBS-Tween pH 7.5 (4°C)

Pour 1L

2.4228 g Tris Base (20mM)

8.766 g NaCl (150mM)

500 μl Tween 20 (0.05%)

Tp Activation MMP pH 7.5 (4°C)

Pour 1L

7.878 g Tris HCl (50mM)

0.735 g CaCl₂ (5mM)

0.2 g NaN₃ (0.02%)

600 μl ZnCl₂ à 10mM (6 μM)

500 μl Brij 35 (0.05%)

Solution colorante

Pour 100 ml

0.1 g Naphtol blue black (0.1%)
 45 ml Ethanol (45%)
 10 ml Acide Acétique (10%)
 45 ml Eau

Solution décolorante

Pour 500 ml

225 ml Ethanol (45%)
 50 ml Acide Acétique (10%)
 225 ml Eau

V. Mode opératoire

Electrophorèse

Décongeler les échantillons ainsi que le **TP d'échantillon** dans la glace.

Faire chauffer la **gélatine** en mettant le tube dans de l'eau chaude.

Couler les **gels de séparation** en ajoutant l'APS puis le TEMED à la fin ; recouvrir avec de l'eau pour accélérer polymérisation ; laisser polymériser au moins 30 min

Couler le **gel de concentration** + Peignes, laisser polymériser pendant 15 min.

Diluer tous les échantillons avec le **TP d'extraction kizaki** pour obtenir une concentration finale égale à la concentration de l'échantillon le moins concentré (dont le volume à déposer est le plus grand).

Diluer le **TP de migration** [x5] au 1/5ième

Mélanger les échantillons avec le **TP d'échantillon**, en proportion 4 :1 de façon à obtenir une concentration de protéines permettant de déposer 30µg dans un volume qui ne dépasse pas 30µl.

Retirer les peignes et remplir les puits avec du **TP de migration** et charger les puits avec les différents échantillons.

Remplir la cuve Avec le **TP de migration**; conditions de migration 2h , 125V à 4°C

Activation de la MMP-2 :

Rincer 1X30 min avec la **solution TBS-T**

Rincer 2X15 min avec **Tp Activation MMP** + 2.5% Triton-X 100 (50ml/gel)

Incuber 18h, 37°C, sous agitation dans le **Tp Activation MMP** (50ml /gel)

Coloration des Gels : 2h dans la **solution colorante** sous agitation à t° ambiante, (10ml /gel)

Décoloration : 30 min dans la **solution décolorante** à t° ambiante, sous agitation (10ml/gel)

Scanner les gels

VI. Consignes de sécurité

Gants. Attention à l'acrylamide

Manipuler le TEMED et l'acide acétique sous la hotte.

VII. Gestion des déchets

Jeter le consommable contaminé par l'acrylamide (cônes de pipette, gants..) ainsi que les gels de polyacrylamide dans les bacs déchets CMR solides Jeter les solutions contenant de l'acrylamide dans les bidons déchets CMR

VIII. Références bibliographiques

Kizaki K, Ushizawa K, Takahashi T, Yamada O, Todoroki J, Sato T, Ito A, 2008. Gelatinase (MMP-2 and -9) expression profiles during gestation in the bovine endometrium. Reproductive Biology and Endocrinology 6, 66.

Détection des Cathepsines par Zymographie mono-dimensionnelle

I. Objet et domaine d'application

L'objectif est de semi-quantifier l'activité des cathepsines dans un échantillon de foie gras.

La détermination l'activité des cathepsines est effectuée par une méthode dérivant de la méthode de (Afonso, Romagnano, & Babiarz, 1997)

II. Principe de la méthode

Les protéines sont séparées selon leurs poids moléculaire sur un gel SDS-PAGE où un substrat protéique (gélatine) a été ajouté avant la polymérisation du gel. Après migration le SDS est éliminé (en rinçant avec un détergeant tel que le triton-X 100) afin de rénaturer les protéases. Le gel est ensuite incubé 18h à 37°C dans le tampon d'activation. Après coloration les bandes blanches qui apparaissent, correspondent aux endroits où le substrat a été dégradé et donc à la protéase.

III. Matériels nécessaires

- Système mini-gels (1 mm spacers; 5ml/mini-gel /Bio-Rad)
- Vortex
- Cuve 4 gels
- Générateur
- Agitateur
- Etuve

IV. Réactifs (chimiques et biologiques)

TP extraction Kizaki (4°C)

| | | | |
|-------------|----|---------------------|-----------|
| Pour 500 ml | | | |
| 3.029 | g | Tris Base pH 7.5 | (50 mM) |
| 4.383 | g | NaCl | (150 mM) |
| 0.0735 | g | CaCl ₂ | (1 mM) |
| 250 | μl | Brij-35 | (0.05%) |
| 1 | ml | Leupeptine (5mg/ml) | (10μg/ml) |
| 5 | ml | PMSF | (1 mM) |

Tris Base-HCl, 1.5M, pH=8.8 (4°C)

Pour 500 ml
90.855 g Tris base

2/3

Tris Base-HCl, 0.5M, pH=6.8 (4°C)

Pour 250 ml
15.155 g Tris base

Solution SDS 10%

Pour 100 ml
10 g SDS

TP échantillon (-20°C)

Pour 5 ml de tampon

1.5 ml Tris Base/HCl 0.5M pH 6.8 (150mM)
 1.5 ml Glycérol (30%)
 2 ml SDS 10% (4%)
 0.01 g BrB (0.2%)

Aliquoter dans des éppendorfs de 1 ml et conserver à -20°C.

Solution Gélatine à 3% (4°C)

Pour 25 ml

0.75 g Gélatine

Ajouter 20 ml d'eau et faire chauffer la solution pour mieux dissoudre la gélatine

Ajuster le volume à 25 ml, aliquoter dans des éppendorfs de 2 ml et conserver à 4°C.

Composition des Gels (quantités pour 4 mini gels ; 1mm épaisseur)

| Réactifs | Gel de séparation (vf=20 ml) | Gel de concentration |
|-------------------|------------------------------|-----------------------|
| Gélatine 3% | 1 ml (0.15%) | - |
| Eau UP | 5.6 ml | 3 ml |
| Acrylamide 40% | 6 ml (12%) | 480 µl |
| Bis-acrylamide 2% | 1.2 ml | 250 µl |
| Tris Base/HCl | 5 ml (1.5M pH 8.8) | 1.25 ml (0.5M pH 6.8) |
| Glycérole | 1 ml | - |
| SDS 10% | 200 µl | - |
| APS 10% | 100 µl | 25 µl |
| TEMED | 10 µl | 5 µl |

TP de migration (4°C)

Pour 1L ; [X5]

72 g Glycine

15.1 g Tris- base

10 g SDS

TP NaAc (4°C)

Pour 2L

16.402 g NaAc pH 5.2

Solution colorante

Pour 100 ml

0.1 g Coomassie Brilliant Blue (0.5%)
 45 ml Ethanol (45%)
 10 ml Acide Acétique (10%)
 45 ml Eau

Solution décolorante

Pour 500 ml

225 ml Ethanol (45%)
 50 ml Acide Acétique (10%)
 225 ml Eau

V. Mode opératoire

Electrophorèse

Décongeler les échantillons ainsi que le **TP d'échantillon** dans la glace.

Faire chauffer la **gélatine** en mettant le tube dans de l'eau chaude.

Couler les **gels de séparation** en ajoutant l'APS puis le TEMED à la fin ; recouvrir avec de l'eau pour accélérer polymérisation ; laisser polymériser au moins 30 min

Couler le **gel de concentration** + Peignes, laisser polymériser pendant 15 min.

Diluer tous les échantillons avec le **TP d'extraction kizaki** pour obtenir une concentration finale égale à la concentration de l'échantillon le moins concentré (dont le volume à déposer est le plus grand).

Diluer le **TP de migration** [x5] au 1/5ième

Mélanger les échantillons avec le **TP d'échantillon**, en proportion 4 : 1 de façon à obtenir une concentration en protéines permettant de déposer 15µg dans un volume qui ne dépasse pas 30µl.

Retirer les peignes et remplir les puits avec du **TP de migration** et charger les puits avec les différents échantillons.

Remplir la cuve Avec le **TP de migration**; conditions de migration 2h , 125V à 4°C

Activation des cathepsines :

Rincer 2X30 min avec le TP NaAc +2.5% Triton-X 100 (50ml/gel)

Incuber 18h, 37°C, sous agitation dans le TP NaAc + 2 mM DTT (50ml /gel)

Coloration des Gels : 2h dans la **solution colorante** sous agitation à t° ambiante, (10ml /gel)

Décoloration : 30 min dans la **solution décolorante** à t° ambiante, sous agitation (10ml/gel)

Scanner les gels

VI. Consignes de sécurité

Gants

Attention à l'acrylamide

Manipuler le TEMED et l'acide acétique sous la hotte.

VII. Gestion des déchets

Jeter le consommable contaminé par l'acrylamide (cônes de pipette, gants..) ainsi que les gels de polyacrylamide dans les bacs déchets CMR solides et les solutions contenant de l'acrylamide dans les bidons déchets électrophorèse CMR

VIII. Références bibliographiques

Afonso, S., Romagnano, L., & Babiarz, B. (1997). The expression and function of cystatin C and cathepsin B and cathepsin L during mouse embryo implantation and placentation. *Development (Cambridge, England)*, 124(17), 3415–3425.

Détection des Calpaines par Zymographie mono-dimensionnelle

I. Objet et domaine d'application

L'objectif est de semi-quantifier l'activité des calpaines dans un échantillon de foie gras.

La détermination l'activité des calpaines est effectuée par une méthode dérivant de la méthode de (Raser et al., 1995)

II. Principe de la méthode

Les protéines sont séparées selon leurs poids moléculaire sur un gel PAGE où un substrat protéique (caséine) a été ajouté avant la polymérisation du gel. La migration se fait dans des conditions reductrices mais non dénaturantes. Après migration les gels sont rincés. Le gel est ensuite incubé 18h à 37°C dans le tampon d'activation. Après coloration les bandes blanches qui apparaissent, correspondent aux endroits où le substrat a été dégradé et donc à la protéase.

III. Matériels nécessaires

- Système mini-gels (1 mm spacers; 5ml/mini-gel /Bio-Rad)
- Vortex
- Cuve 4 gels
- Générateur
- Agitateur
- Etuve

IV. Réactifs (chimiques et biologiques)

TP extraction calpaines (4°C)

| | | | |
|-------------|----|-------------------|--------|
| Pour 500 ml | | | |
| 3.028 | g | Tris Base | (50mM) |
| 2.9 | g | EDTA | (20mM) |
| 1.9 | g | EGTA | (10mM) |
| 500 | µl | β-Mercaptoéthanol | (0.1%) |
| pH 8.8 | | | |

TP échantillon (-20°C)

| | | | |
|-----------|----|----------------------------|---------|
| Pour 5 ml | | | |
| 1.5 | ml | 0.5 M Tris Base/HCl pH 6.8 | (150mM) |
| 1.5 | ml | Glycérole | (30%) |
| 0.01 | g | Bromophénol Blue | (0.2%) |
| 37.5 | µl | β-Mercaptoéthanol | (0.75%) |
| 2 | ml | Eau ultra pure | |

Solution caséine à 2% (4°C)

Pour 25 ml

0.5 g caséine

Ajouter 20 ml d'eau et faire chauffer la solution pour mieux dissoudre la caséine

Ajuster le volume à 25 ml, aliquoter dans des éppendorfs de 2.5 ml et conserver à 4°C

Composition des Gels (quantités pour 4 mini gels ; 1mm épaisseur)

| Réactifs | Gel de séparation (vf=20 ml) | Gel de concentration |
|-------------------|------------------------------|-----------------------|
| Caséine 2% | 2 ml (0.2%) | - |
| Eau UP | 3 ml | 3 ml |
| Acrylamide 40% | 5 ml (10%) | 480 µl |
| Bis-acrylamide 2% | 4 ml | 250 µl |
| Tris Base/HCl | 5 ml (1.5M pH 8.8) | 1.25 ml (0.5M pH 6.8) |
| Glycérole | 1 ml | - |
| APS 10% | 100 µl | 25 µl |
| TEMED | 10 µl | 5 µl |

TP de migration (4°C)

Pour 1L ; [X5]

72 g Glycine

15.1 g Tris- base

1.45 g EDTA

1.91 g EGTA

TP Activation Calpaines

Pour 1L [X5]

12.114 g Tris Base (20 mM)

5.6 g CaCl₂ (10 mM)

Solution colorante

Pour 100 ml

0.1 g Coomassie Brilliant Blue (0.5%)

45 ml Ethanol (45%)

10 ml Acide Acétique (10%)

45 ml Eau

Solution décolorante

Pour 500 ml

225 ml Ethanol (45%)

50 ml Acide Acétique (10%)

225 ml Eau


V. Mode opératoire

Electrophorèse

Décongeler les échantillons ainsi que le **TP d'échantillon** dans la glace.

Couler les **gels de séparation** en ajoutant l'APS puis le TEMED à la fin ; recouvrir avec de l'eau pour accélérer polymérisation ; laisser polymériser au moins 30 min

Couler le **gel de concentration** + Peignes, laisser polymériser pendant 15 min.

| | | |
|--|------------------------|------------|
|  | MODE OPERATOIRE | Page : 3/3 |
| | Annexe 6 | |

Diluer tous les échantillons avec le **TP d'extraction calpaines** pour obtenir une concentration finale égale à la concentration de l'échantillon le moins concentré (dont le volume à déposer est le plus grand).

Diluer le **TP de migration** [x5] au 1/5^{ième}

Mélanger les échantillons avec le **TP d'échantillon**, en proportion 4 :1 de façon à obtenir une concentration en protéines permettant de déposer 30 µg dans un volume qui ne dépasse pas 30µl.

Retirer les peignes et remplir les puits avec du **TP de migration** et charger les puits avec les différents échantillons.

Remplir la cuve Avec le **TP de migration**; conditions de migration 2h , 125V à 4°C

Activation des calpaines :

Rincer 2X30 min avec le TP Activation calpaines (50ml/gel)

Incuber 18h, 37°C, sous agitation dans le TP Activation calpaines + 10 mM DTT (50ml /gel)

Coloration des Gels : 2h dans la **solution colorante** sous agitation à t° ambiante, (10ml /gel)

Décoloration : 30 min dans la **solution décolorante** à t° ambiante, sous agitation (10ml/gel)

Scanner les gels

VI. Consignes de sécurité

Gants

Attention à l'acrylamide

Manipuler le DTT, β-Mercaptoéthanol, TEMED et l'acide acétique sous la hotte.

VII. Gestion des déchets

Jeter le consommable contaminé par l'acrylamide (cônes de pipette, gants..) ainsi que les gels de polyacrylamide dans les bacs déchets CMR solides et les solutions contenant de l'acrylamide, DTT ou β-Mercaptoéthanol dans les bidons déchets électrophorèse CMR

VIII. Références bibliographiques

Raser, K. J., Posner, A., & Wang, K. K. (1995). Casein zymography: a method to study mu-calpain, m-calpain, and their inhibitory agents. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 319(1), 211–216. doi:10.1006/abbi.1995.1284

SDS-PAGE
I. Objet et domaine d'application

L'objectif est de semi-quantifier les protéines dans un échantillon de foie gras

II. Principe de la méthode

Les protéines sont séparées selon leurs poids moléculaire sur un gel SDS-PAGE. Après migration les gels sont rincés. Le gel est ensuite incubé 18h à température ambiante dans une solution colorante. Après coloration les bandes bleues qui apparaissent, correspondent aux différentes protéines

III. Matériels nécessaires

- Système mini-gels (1 mm spacers; 5ml/mini-gel /Bio-Rad)
- Vortex
- Cuve 4 gels
- Générateur
- Agitateur

IV. Réactifs (chimiques et biologiques)
TP extraction (4°C)

Pour 500 ml

| | | | |
|-------|----|-------------------|--------|
| 3.028 | g | Tris Base | (50mM) |
| 2.9 | g | EDTA | (20mM) |
| 1.9 | g | EGTA | (10mM) |
| 500 | μl | β-Mercaptoéthanol | (0.1%) |
| | | pH 8.8 | |

Tris Base-HCl, 1.5M, pH=8.8 (4°C)

Pour 250 ml

90.855 g Tris base

Tris Base-HCl, 0.5M, pH=6.8 (4°C)

Pour 250 ml

15.155 g Tris base

2/3

TP échantillon (-20°C)

Pour 2 ml de tampon

| | | |
|-----|----|---------------------------|
| 240 | μl | Tris Base/HCl 0.5M pH 6.8 |
| 400 | μl | Glycérol |
| 400 | μl | SDS 10% |
| 10 | μl | BrB 1% |
| 100 | μl | β-Mercaptoéthanol |

Aliquoter dans des éppendorfs de 1 ml et conserver à -20°C.

Composition des Gels (quantités pour 4 mini gels ; 1mm épaisseur)

| Réactifs | Gel de séparation (vf=20 ml) | Gel de concentration |
|-------------------|------------------------------|-----------------------|
| Eau UP | 7.8 ml | 3 ml |
| Acrylamide 40% | 4.9 ml (10%) | 480 µl |
| Bis-acrylamide 2% | 1 ml | 250 µl |
| Tris Base/HCl | 5 ml (1.5M pH 8.8) | 1.25 ml (0.5M pH 6.8) |
| Glycérole | 1 ml | - |
| SDD 10% | 200 µl | |
| APS 10% | 100 µl | 25 µl |
| TEMED | 10 µl | 5 µl |

TP de migration (4°C)

Pour 1L ; [X5]

72 g Glycine

15.1 g Tris- base

10 g SDS

Solution colorante

Fermentas blue Protein Staining solution (15ml/gel).

V. Mode opératoire

Electrophorèse

Décongeler les échantillons ainsi que le **TP d'échantillon** dans la glace.

Couler les **gels de séparation** en ajoutant l'APS puis le TEMED à la fin ; recouvrir avec de l'eau pour accélérer la polymérisation ; laisser polymériser au moins 30 min

Couler le **gel de concentration** + Peignes, laisser polymériser pendant 15 min.

Diluer tous les échantillons avec le **TP d'extraction** pour obtenir une concentration finale égale à la concentration de l'échantillon le moins concentré (dont le volume à déposer est le plus grand).

Diluer le **TP de migration** [x5] au 1/5ième

Mélanger les échantillons avec le **TP d'échantillon**, en proportion 4 : 1 de façon à obtenir une concentration en protéines permettant de déposer 40µg dans un volume qui ne dépasse pas 20µl.

Retirer les peignes et remplir les puits avec du **TP de migration** et charger les puits avec les différents échantillons.

Remplir la cuve Avec le **TP de migration**; conditions de migration 2h , 125V à 4°C

Rincer les gels 2 x 10 min dans de l'eau permutée

Coloration des Gels : 18 h dans la **solution colorante** sous agitation à t° ambiante, (15ml /gel)

Décoloration : 1h dans la **de l'eau** puis 5 h dans une solution à 10% Acide Acétique, (10ml/gel)

VI. Consignes de sécurité

Gants

Attention à l'acrylamide

Manipuler le DTT, β-Mercaptoéthanol, TEMED et la solution colorante sous la hotte.

VII. Gestion des déchets

Jeter le consommable contaminé par l'acrylamide (cônes de pipette, gants..) ainsi que les gels de polyacrylamide dans les bacs déchets CMR solides et les solutions contenant de l'acrylamide, DTT ou β-Mercaptoéthanol dans les bidons déchets électrophorèse CMR

Liste des abréviations

| | |
|---------|---|
| AMPc | Adénosine monophosphate cyclique |
| APC | Antigen-presenting cells |
| Arg | Arginine |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| CARD | Caspase activation and recruitment domain |
| CBS | Cystathionine beta synthase |
| CE | Cholestérol estérifié |
| CoA | Coenzyme A |
| Cts | Cathepsine |
| DED | Death Effector Domain |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECM | Matrice Extra-Cellulaire |
| EDTA | Acide éthylène diamine tétracétique |
| F | Fast |
| HDLP | High Density lipoprotein |
| HMG-CoA | hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA |
| IAA | iodoacetamide |
| IDL | Intermediate Density lipoprotein |
| LDL | Low Density lipoprotein |
| Leu | Leucine |
| Lys | Lysine |
| MAT | Matière azotée totales |
| MEG | Mise en gavage |
| MMP | Matrix metalloproteinase |
| NADH | Nicotinamide adénine dinucléotide Hydrate |
| NADPH | Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate |
| PAGE | Polyacrylamide gel electrophoresis |
| PC | Phosphatidylcholine |
| PE | Phosphatidyléthanolamine |
| PPi | Pyrophosphates |
| S | Slow |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate |
| TIMP | Tissue inhibitor of metalloproteinase |
| UDP | Uridine diphosphate |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Composition chimique (en % de la matière fraîche) des foies d'oies et de canards de barbarie ou Mulard après gavage | 7 |
| Tableau 2 : Composition chimique d'un aliment canard gras pendant ses trois périodes d'élevage . | 13 |
| Tableau 3 : Evolution de la composition biochimique et du profil des acides gras du foie au cours du gavage | 26 |
| Tableau 4 : Conséquences des techniques de refroidissement sur la teneur en eau, en matières grasses et sur le taux de fonte de trois catégories de foies (mou, souple et dur). | 39 |
| Tableau 5 : Classification des MMPs selon leur spécificité de substrat, leur similarité de séquence et l'organisation de leurs domaines. | 48 |
| Tableau 6 : Propriétés des différentes cathepsines des mammifères | 51 |
| Tableau 7 : Différentes analyses faites sur les échantillons des 3 expérimentations..... | 71 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Influence du mode d'éviscération sur la qualité technologique du foie gras d'oie | 9 |
| Figure 2 : Synthèse du glycogène par la voie de la glycogénogenèse. | 13 |
| Figure 3 : Principales étapes de la glycolyse. | 15 |
| Figure 4 : Réactions enzymatiques du cycle de Krebs..... | 16 |
| Figure 5 : Voie de synthèse du cholestérol | 19 |
| Figure 6 : Le métabolisme hépatique des protéines..... | 22 |
| Figure 7 : la progression histopathologique de la stéatose non-alcoolique..... | 24 |
| Figure 8 : Ancien bas-relief représentant des égyptiens nourrissant des canards avec des figues. | 24 |
| Figure 9 : Les 3 formes commerciales de foie gras : foie gras entier, foie gras et bloc de foie gras...32 | |
| Figure 10 : Facteurs affectant le rendement à la cuisson | 34 |
| Figure 11 : Expression de la variabilité de la fonte lipidique du foie gras de canard. | 35 |
| Figure 12 : Les Protéases sont classées au sous-groupe 4 du 3 ^{ème} groupe (hydrolases). | 41 |
| Figure 13 : Exemples de différentes réactions enzymatiques: aminopeptidase vs carboxypeptidase .43 | |
| Figure 14 : Schéma de la structure cristallographique en ruban de la MMP-1..... | 47 |
| Figure 15 : Schéma de la structure cristallographique en ruban de la m-calpaïne humaine..... | 55 |
| Figure 16 : structure du protéasome 26S | 57 |
| Figure 17 : les caspases chez les mammifères | 59 |
| Figure 18 : Mécanisme de la toxicité et sa progression due à la libération des calpaïnes | 63 |
| Figure 19 : Implication de la cathepsine B dans la voie de l'apoptose par l'induction de la libération du cytochrome c par la mitochondrie en dégradant des substrats cytosoliques non-identifiés. La libération du cytochrome induit le clive des caspase-9 et 3 suivit par d'autres changement apoptotiques | 66 |
| Figure 20 : Stéatose et Autophagie chez les souris ob/ob..... | 67 |
| Figure 21 : Zymogrames , A : MMP-2, B : Cathepsines et C : calpaïnes..... | 77 |
| Figure 22 : Gel SDS-PAGE | 79 |

Communications et publications réalisées

S. Awde. (2011). Cellular proteolysis in liver and relationships during general liver steatosis. Colloquium Biochimie: Bioquímica y sus aplicaciones, Valencia, Venezuela. 22-23 June.

S. Awde, N. Marty-Gasset, J. Wilkesman and H. Rémignon. (2013). Etude des Protéases Hépatiques avant et à la fin du gavage chez Les canards de barbarie et pékin. 10èmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, La Rochelle, France. 26-28. Mars.

S. Awde, N. Marty-Gasset, J. Wilkesman and H. Rémignon. (2013). Proteolytic activity alterations resulting from force-feeding in Muscovy and Pekin ducks. *Poultry Science*. 99 (11): 2997-3002

L. Kurz , M.F. Padrón, **S. Awde**, H. Rémignon, J. Wilkesman. (2013). Protease characterization in duck liver steatosis by 1- and 2-dimensional zymography. 13th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins, Galveston, Texas, US. 5-7 October.

S. Awde, N. Marty-Gasset, K. Prahkarnkao and H. Rémignon. (2014). Relationship Between Proteolytic Activities and Cooking Loss Variability in Liver Issued from Force-Fed Mule Ducks. Soumis dans *Journal of Agriculture and Food Chemistry*

S. Awde, N. Marty-Gasset, G. Sandri, A. Dalle Zotte and H. Rémignon. (2014). Effect of chilling methods on the quality parameters of mule duck “foie gras”. A soumettre dans *Meat Science*

Table des Matières

| | |
|---|-----------|
| REMERCIEMENTS | 3 |
| RESUME | 4 |
| ABSTRACT | 5 |
| INTRODUCTION..... | 6 |
| ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 11 |
| 1. LE METABOLISME HEPATIQUE CHEZ LES OISEAUX | 12 |
| 1.1. LE METABOLISME GLUCIDIQUE | 12 |
| 1.1.1. <i>Glycogénèse</i> | 13 |
| 1.1.2. <i>Utilisation de glucose</i> | 14 |
| 1.2. LE METABOLISME LIPIDIQUE | 16 |
| 1.2.1. <i>Utilisation des lipides alimentaires</i> | 17 |
| 1.2.2. <i>Synthèse des acides gras de novo</i> | 17 |
| 1.2.2.1. <i>Synthèse des glycérides, des phospholipides et du cholestérol</i> | 18 |
| 1.3. LE METABOLISME DES PROTEINES | 20 |
| 2. LA STEATOSE HEPATIQUE..... | 23 |
| 2.1. MECANISMES DE LA STEATOSE HEPATIQUE CHEZ LES PALMIPEDES | 28 |
| 3. QUALITE DU FOIE GRAS | 30 |
| 3.1. LES COMPOSANTS DE LA QUALITE DU FOIE GRAS..... | 31 |
| 3.2. LE RENDEMENT TECHNOLOGIQUE APRES CUISSON | 32 |
| 3.3. LES PARAMETRES INFLUENÇANT LE RENDEMENT TECHNOLOGIQUE | 33 |
| 4. LES PROTEASES..... | 40 |
| 4.1. CLASSEMENT DES PROTEASES HEPATIQUES..... | 42 |
| 4.1.1 <i>Les exoprotéases</i> | 42 |
| 4.1.2 <i>Les endopeptidases</i> | 44 |
| 4.2 LES PRINCIPALES PROTEASES | 45 |
| 4.2.1 <i>Les MMPs</i> | 45 |
| 4.2.2 <i>Les Cathepsines</i> | 49 |
| 4.2.3 <i>Les calpaïnes</i> | 53 |
| 4.2.4 <i>Le Protéasome</i> | 56 |
| 4.2.5 <i>Les caspases</i> | 58 |
| 5. PROTEOLYSE ET PATHOLOGIES HEPATIQUES..... | 61 |
| MATERIELS ET METHODES | 70 |
| 1. INTRODUCTION | 71 |
| 2. RENDEMENT TECHNOLOGIQUES | 72 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 2.1. | TEST DE VERRINE | 72 |
| 2.2. | MICRO-TEST DE FONTE | 72 |
| 2.3. | TEST DE LA FAISSELLE..... | 72 |
| 3. | MESURES BIOCHIMIQUES..... | 73 |
| 3.1. | DETERMINATION DU TAUX DE MATIERES SECHES | 73 |
| 3.2. | DETERMINATION DU TAUX DES LIPIDES | 73 |
| 3.3. | DOSAGE DU TAUX DE MATIERES AZOTEES TOTALES | 74 |
| 4. | ANALYSES PROTEOMIQUES..... | 74 |
| 4.1. | EXTRACTION ET DOSAGE DES PROTEINES | 75 |
| 4.2. | DOSAGE DES PROTEINES | 75 |
| 4.3. | ELECTROPHORESES | 75 |
| 4.3.1. | <i>Zymographie</i> | 75 |
| 4.3.1.1. | <i>Préparation des échantillons</i> | 76 |
| 4.3.1.2. | <i>Séparation des protéines</i> | 76 |
| 4.3.1.3. | <i>Activation des protéases</i> | 76 |
| 4.3.1.4. | <i>Coloration des gels</i> | 78 |
| 4.3.1.5. | <i>Analyse d'images</i> | 78 |
| 4.3.2. | <i>SDS-Page</i> | 78 |
| 4.3.2.1. | <i>Analyse d'image</i> | 79 |
| 4.3.2.2. | <i>Identification des protéines</i> | 79 |
| 5. | ANALYSE STATISTIQUES..... | 80 |
| | RESULTATS..... | 81 |
| | ARTICLE 1 | 82 |
| | ARTICLE 2 | 101 |
| | ARTICLE 3 | 132 |
| | DISCUSSION GENERALE..... | 153 |
| | CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES..... | 163 |
| | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 167 |
| | ANNEXES | 179 |
| | LISTE DES ABREVIATIONS | 197 |
| | LISTE DES TABLEAUX..... | 198 |
| | LISTE DES FIGURES | 199 |
| | COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS REALISEES | 200 |